

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA BYC (*Boophilus* *Yolk pro-Cathepsin*) RECOMBINANTE EM UMA VACINA CONTRA O CARRAPATO
*Boophilus microplus***

Tese de Doutorado

ALEXANDRE TRINDADE LEAL

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA BYC (*Boophilus* *Yolk pro-Cathepsin*) RECOMBINANTE EM UMA VACINA CONTRA O CARRAPATO

Boophilus microplus

Alexandre Trindade Leal

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dr^a. Aoi Masuda

Co-orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

Porto Alegre

Março, 2006

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul - UFRGS, com apoio financeiro do CNPq, PRONEX, FINEP e FAPERGS.

*Vivemos esperando
O dia em que seremos melhores
Melhores no amor, melhores na dor
Melhores em tudo...
(Rogério Flausino)*

DEDICATÓRIA

À meu filho Augusto e minha Família, por tudo que representam.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Aoi Masuda, pela oportunidade e ensinamentos transmitidos nesse período.

Ao Dr. Itabajara Vaz, pela orientação e valiosa contribuição na execução dos trabalhos.

À Dra. Sandra Farias, pelos ensinamentos com cultivo celular e amizade.

Aos membros da comissão de acompanhamento, Dra. Ana Paula Ravazollo e Dr. Luiz Augusto Basso, pelas contribuições durante a realização do trabalho.

Ao amigo Carlos Alexandre, pela colaboração e estímulo.

Ao “irmão” Ilo Dias, pelo auxílio, companheirismo e incentivo em todos os momentos.

À Irina, pela acolhida e alegria na convivência. Ao Fábio e a Juli, pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal: Dani, Paula, Josiane, Carol, Luiz Fernando, Roberta, Luciana, Juliana, Juliana Dalpian, Filipe, Raquel, Elenara, Maria Lúcia e Herbert, entre outros; obrigado pelo convívio, cooperação e amizade.

Ao Professor Carlos Termignoni e todos os colegas do seu laboratório, em especial a Adriana Seixas, pela colaboração e amizade.

Um agradecimento especial a todos os colegas, de diferentes laboratórios, que participaram das coletas de carrapato, durante os experimentos de infestação. O auxílio de cada um foi fundamental para execução dos experimentos.

Aos colegas de outros laboratórios do Centro de Biotecnologia.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial ao Paulo, Milton, Luciano e a Silvia, pela constante colaboração e amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos órgãos de fomento CNPq, CNPq-PRONEX, FINEP e FAPERGS.

À minha família, em especial meus Pais, pela compreensão e apoio incondicional.

À Daniela e ao Paulo Monteiro, pelo auxílio e apoio.

À minha esposa Adriana e meu filho Augusto, pela compreensão durante minha ausência, pelas dificuldades partilhadas, pelas experiências vividas e, principalmente, pelo amor e carinho.

À Deus!

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.

Não na vitória propriamente dita.

(Mahatma Gandhi)

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. O carrapato <i>Boophilus microplus</i>	13
1.2. Ciclo de vida	15
1.3. Métodos de controle	16
1.3.1. Controle químico	16
1.3.2. Controle biológico	17
1.3.3. Controle imunológico	20
1.4. A proteína <i>Boophilus</i> <i>Yolk pro-Cathepsin</i> (BYC)	25
1.5. Outros antígenos de <i>B. microplus</i>	26
2. OBJETIVOS	35
CAPÍTULO I	36
CAPÍTULO II	46
3. DISCUSSÃO	67
4. CONCLUSÕES	83
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
6. ANEXOS	101
ANEXO 1	102
ANEXO 2	103
ANEXO 3	104
ANEXO 4	105

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

° C	graus Celsius
µg	microgramas
µl	microlitros
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BmTIs	inibidores de tripsina de <i>B. microplus</i>
BrBm5	anticorpo monoclonal anti-BYC de <i>B. microplus</i>
BYC	<i>Boophilus</i> <i>Yolk pro-Cathepsin</i>
BYCr	<i>Boophilus</i> <i>Yolk pro-Cathepsin</i> recombinante
cDNA	DNA complementar
CI	corpúsculo de inclusão
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
CRT	calreticulina
DNA	ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GST	glutathiona S-trasferase
g	grama
h	hora
HPRT	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
IFN-γ	interferon gama
IGBP	<i>immunoglobulin G-binding protein</i>
IgG	imunoglobulina G
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-10	interleucina 10
IPTG	isopropionil-B-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	quilodalton = 1000 daltons
l	litro
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
MBP	<i>maltose binding protein</i>

mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
NBT	nitroblue tetrazolium
OPD	o-phenylenediamine
PAGE	<i>polyacrylamide gel eletrophoresis</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PRM	paramiosina
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio
THAP	<i>Tick Heme-binding Aspartic</i> proteinase
Trx	tioredoxina
VTDC	cisteino endopeptidase degradadora de vitelina

RESUMO

O carrapato *Boophilus microplus* é um ectoparasita hematófago que infesta os rebanhos bovinos de regiões tropicais e subtropicais, causando grande prejuízo à pecuária. O principal método de controle deste parasita baseia-se no uso de acaricidas, entretanto, o uso de vacinas tem sido estudado como um método de controle promissor. A *Boophilus* *Yolk pro-Cathepsin* (BYC) é uma aspártico proteinase presente no ovo do carrapato e envolvida na embriogênese que foi anteriormente testada como imunógeno vacinal. Neste estudo, o cDNA da BYC foi amplificado por PCR e clonado em dois vetores de expressão para produção de duas formas da proteína recombinante com cauda de histidina, rBYC e rBYC-Trx (fusionada com tioredoxina). As duas formas foram expressas em *Escherichia coli* na forma de corpúsculos de inclusão (CI) e comparadas quanto ao nível de expressão, solubilidade e rendimento na purificação. Três agentes desnaturantes (N-lauroil sarcosina, hidrocloreto de guanidina e uréia) foram testados para solubilização dos CIs. Sarcosina foi o agente mais eficiente, solubilizando mais de 90 % de rBYC-Trx e rBYC. As duas proteínas recombinantes foram purificadas em cromatografia de afinidade por metal (Ni^{2+}), sob condições desnaturantes. O rendimento na purificação da proteína solúvel foi de 84 % para r-BYC-Trx e 6 % para rBYC. As duas formas foram reconhecidas por soro de coelhos, camundongos e bovinos previamente imunizados com BYC nativa, demonstrando a existência de epítomos comuns entre a BYC nativa e as formas recombinantes expressas em *E. coli*. Para verificar o potencial vacinal da proteína recombinante, um grupo de bovinos Hereford foi imunizado com rBYC e desafiado com 20.000 larvas de *B. microplus* por animal. Os soros dos bovinos

imunizados reconheceram a BYC nativa em ELISA e “Western blot”, com títulos entre 500 e 4.000. Os resultados do desafio mostraram uma proteção parcial contra a infestação, com 25 % de proteção global. O perfil de expressão de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ) foi verificado por RT-PCR, porém os resultados não permitiram identificar a polarização da resposta imune em Th1 ou Th2. Os resultados de imunoproteção obtidos com a BYC recombinante foram similares aos obtidos na imunização de bovinos com BYC nativa, indicando a possibilidade de uso da forma recombinante como imunógeno vacinal.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, BYC, aspartico proteinase, corpúsculos de inclusão, vacina, carrapato, bovinos.

ABSTRACT

The tick *Boophilus microplus* is a bovine ectoparasite present in tropical and subtropical areas of the world and the use of vaccines is the promising method for tick control. BYC is an aspartic proteinase found in eggs that is involved in embryogenesis of *B. microplus* and has been proposed as an important antigen in vaccine development. The cDNA of BYC was amplified by PCR and cloned for expression in two forms with thioredoxin fusion protein (Trx) and without Trx, coding the recombinant proteins named rBYC-Trx and rBYC, respectively. Expression, solubility and refolding yields of the two forms were analyzed. The recombinant proteins were expressed in inclusion bodies (IBs) and three denaturing (N-lauroyl sarcosine, guanidine hydrochloride and urea) were tested for IBs solubilization. The N-lauroyl sarcosine was the most efficient denaturant and

solubilized up to 90 % of rBYC-Trx and rBYC IBs. Two recombinant forms were affinity-purified by Ni²⁺ Sepharose resin under denaturing conditions. After refolding, the yield of soluble protein was 84 % for r-BYC-Trx and 6 % for rBYC. These proteins were immune-reactive with rabbit, mouse and bovine sera previously immunized with native BYC, which confirms the antigenicity of the recombinant BYCs expressed in the *E. coli* system. In order to verify the vaccine potential of a recombinant BYC expressed in *E. coli* the purified rBYC was used for immunization of Hereford cattle. The serum of bovine immunized with rBYC recognized the native BYC with a titer ranging from 500 to 4,000. Furthermore, immunized bovines challenged with 20,000 larvae presented an overall protection of 25 % demonstrating a partial protection against *B. microplus* infestation. The cytokine profile (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ) was verified by RT-PCR however it did not allow the identification of Th1 or Th2 polarized response associated with rBYC immunization. The results obtained with recombinant protein (rBYC) immunization were similar to the native BYC immunization and suggest the possibility of using rBYC as a component of a multiantigen vaccine.

Keywords: *Boophilus microplus*, BYC, aspartic proteinase, inclusion body, tick vaccine, bovine.

1. INTRODUÇÃO

1. 1. O carrapato *Boophilus microplus*

O *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887), chamado popularmente como carrapato do boi ou carrapato bovino, é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo praticamente único hospedeiro é o bovino. Este carrapato pertence ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acarina e família Ixodidae, conhecida como família dos carrapatos duros, que se caracterizam pela presença de escudo quitinoso. Os membros da classe Arachnida caracterizam-se pela presença de quatro pares de patas, corpo composto de cefalotórax e abdômen e peças bucais modificadas (URQUHART *et al.*, 1998). O *B. microplus* encontra-se amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania entre os paralelos 32°N e 32°S (JOHNSTON *et al.*, 1986), sendo um dos principais parasitos que afetam a pecuária destas áreas. O parasitismo pelo carrapato bovino acarreta significativo dano econômico à pecuária bovina (HORN & ARTECHE, 1985), sendo o principal alvo de programas de controle e erradicação de parasitas nos rebanhos da América do Sul (NARI, 1995). Durante a fase parasitária, um único carrapato suga de 2 a 3 ml de sangue (GONZALES, 1995), o que se reflete em grandes perdas na produção de leite e carne (SUTHERST *et al.*, 1983), além dos danos ao couro causados pelas lesões e reações inflamatórias nos pontos de fixação do carrapato (SEIFERT *et al.*, 1968). Portanto, os prejuízos estão diretamente relacionados ao grau de infestação da população, tornando os meios de controle fundamentais para viabilidade econômica da pecuária. Além da ação espoliativa, o *B. microplus* é vetor de doenças infecciosas, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários

do gênero *Babesia* e pela riquetsia *Anaplasma marginale* (McCOSKER, 1981; YOUNG & MORZARIA, 1986). Além dos prejuízos diretos causados pela infestação parasitária, existem as despesas vinculadas aos métodos de controle, como mão-de-obra envolvida, despesas com instalações e equipamentos necessários à aplicação de carrapaticidas nos rebanhos, aquisição de carrapaticidas e período de carência após aplicação das drogas, entre outros (CORDOVÉS, 1996). Estima-se que, anualmente, as perdas decorrentes da infestação pelo *B. microplus* cheguem a 1 bilhão de dólares americanos no Brasil (GOMES, 2000). Estudos recentes na Austrália, calculam uma perda anual de 4 milhões de dólares na criação de gado, 49 % desta perda devido aos custos do controle do carrapato e 51 % devido a perdas na produção de leite, carne e couro (JONSSON *et al.*, 2000).

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina do mundo, possui um rebanho bovino de aproximadamente 200 milhões de cabeças, produzindo aproximadamente 8,5 milhões de toneladas de carne e 23 bilhões de litros de leite por ano (CNPIC, 2005; IBGE, 2004). Em 2005 as exportações de carne bovina bateram um recorde, com 2,3 milhões de toneladas embarcadas e receita de US\$ 3,1 bilhões, um aumento de 22 % em relação ao ano de 2004 (CNPIC, 2005; ABIEC, 2005; MDIC, 2005). Neste contexto, o controle do carrapato bovino é fundamental para a manutenção da sanidade do rebanho nacional e o desenvolvimento da bovinocultura, uma atividade de fundamental importância para o país.

1.2. Ciclo de vida

O ciclo biológico do *B. microplus* divide-se em duas fases:

a) Fase de vida livre: esta fase ocorre no meio ambiente e pode variar de aproximadamente 30 dias, quando há boas condições climáticas, até vários meses em condições adversas de temperatura e umidade. As teleóginas (fêmeas completamente ingurgitadas) ao desprenderem-se do hospedeiro caem ao solo, dando início a fase de vida livre. As teleóginas possuem geotropismo e buscam abrigo no solo e vegetação para iniciar o processo de postura, logo após o período de pré-postura. Este período corresponde ao tempo necessário para formação dos ovos e dura de 2 a 3 dias em temperatura ideal, podendo se estender por muitos dias em épocas de frio. Temperatura de 27 °C e umidade superior a 70 % são as condições ideais para o desenvolvimento do *B. microplus* (GONZALES, 1995). Nestas condições, a fase seguinte chamada de período de postura dura aproximadamente 15 dias, quando as teleóginas realizam a oviposição, podendo chegar a 3.000 ovos / teleógina. Aproximadamente sete dias após o final da postura, inicia-se a eclosão dos ovos, que dura em torno de 5 dias. Após um período de aproximadamente 7 dias as neolarvas transformam-se em larvas infestantes, aptas à iniciar a fase de vida parasitária. Em baixas temperaturas as larvas podem sobreviver por vários meses, mas a capacidade infestante restringe-se aos primeiros 90 dias (GONZALES, 1995).

b) Fase de vida parasitária: Esta fase inicia-se quando a larva infestante instala-se no hospedeiro, e dura em média 21 dias. As larvas migram para determinadas regiões corporais, como a região posterior das coxas e as regiões perianal e perivulvar, as quais são mais propícias para o seu desenvolvimento em

virtude da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de auto limpeza do hospedeiro (WAGLAND, 1978; CORDOVÉS, 1996). Durante a fase parasitária, o carrapato passa por vários instares até atingir a fase adulta. Os instares e seus respectivos períodos de duração são: larva à metalarva (4 dias, em média); metalarva à ninfa (4 dias); ninfa à metaninfa (3 dias); a partir desta etapa ocorre a diferenciação sexual; metaninfa à neandro (3 dias) e gonandro (1-2 dias) – macho adulto; metaninfa à neógina (4 dias); neógina à partenógina (3 dias) e partenógina à teleógina (3-4 dias) – fêmea adulta (GONZALES, 1995).

1.3. Métodos de controle

1.3.1. Controle químico

O uso de acaricidas é o método de controle do carrapato bovino que mais foi utilizado no século XX (PRUETT, 1999). Apesar de ser o único método eficaz atualmente disponível, o controle químico é dispendioso e causa danos ao meio ambiente e à saúde pública, devido a presença de resíduos tóxicos nos produtos de origem bovina. Ao longo do tempo foram utilizados, seqüencialmente, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidinas, piretróides e avermectinas (GEORGE *et al.*, 2004). Apesar da alta toxidez destes pesticidas, como os organoclorados e organofosforados (GEORGE *et al.*, 2004), o principal motivo da troca dos princípios ativos tem sido o surgimento de populações de carrapatos resistentes. Na década de 30 foram descritos os primeiros casos de resistência aos compostos arsenicais, a partir disso, novos casos de resistência, para as

diferentes drogas introduzidas, foram descritos ao longo do século XX (SEDDON, 1967; WHARTON & NORRIS, 1980; GEORGE *et al.*, 2004). Foi observado o desenvolvimento de resistência até mesmo às avermectinas, que tiveram seu uso intensificado no Brasil a partir da década de 90 (MARTINS & FURLONG, 2001). O *B. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos, presumivelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações (KOCAN, 1995). O emprego de subdosagem, problema freqüentemente observado no controle químico, é outra causa sugerida como fator de seleção de carrapatos resistentes. Novos acaricidas, como os inibidores de desenvolvimento fluazuron e fipronil, estão sendo testados no mercado e, como seu uso ainda é relativamente recente, não foi detectado nenhum caso relevante de resistência até o momento (SABATINI *et al.*, 2001; GEORGE *et al.*, 2004).

As limitações do controle químico, como resistência às drogas, alto custo dos acaricidas e da mão-de-obra usada na aplicação e a presença de resíduos tóxicos na carne, no leite e no ambiente, têm levado à busca de métodos alternativos para o controle do *B. microplus* (NOLAN, 1985; PRUETT, 1999). Atualmente, os controles biológico e imunológico já constituem parte de programas de controle integrado de ectoparasitas, que ainda exigem a utilização de produtos químicos (PRUETT, 1999).

1.3.2. Controle biológico

O *B. microplus* possui vários inimigos naturais que interferem em etapas distintas do ciclo biológico do carrapato. Condições climáticas adversas e a ação de predadores naturais, como a garça vaqueira *Egretta ibis* (ALVES-BRANCO *et*

al., 1983) e formigas são exemplos de inimigos naturais que podem reduzir o nível de infestação em uma determinada área (GONZALES, 1995). A seleção de raças menos sensíveis ao carrapato; a rotação de pastagens (ELDER *et al.*, 1980) e o uso de espécies forrageiras que dificultam a sobrevivência das fases de vida livre (SUTHERST *et al.*, 1982; FARIAS *et al.*, 1986); o manejo do rebanho (WHARTON & NORRIS, 1980) e o uso de patógenos (bactérias, fungos, nematódeos e parasitóides) para o carrapato tem sido estudados como meios para o controle biológico do carrapato *B. microplus* (SAMISH *et al.*, 2004). O controle biológico clássico inclui a preservação dos inimigos naturais locais e o aumento dos agentes biocontroladores, geralmente como parte de um programa de manejo integrado de pragas (SAMISH *et al.*, 2004).

O tipo de vegetação é um dos fatores capazes de influenciar o ciclo do carrapato, pastagens nativas com vegetação arbustiva proporcionam abrigo as teleóginas em postura, enquanto que algumas pastagens, por serem tóxicas, repelentes ou por imobilizarem as larvas através de secreções ou estruturas da planta, podem limitar bastante o número de carrapatos. Em especial, o plantio de gramíneas do gênero *Stylosanthes* (SUTHERST *et al.*, 1982) e do capim gordura (*Melinis minutiflora*) (FARIAS *et al.*, 1986) podem contribuir consideravelmente para o controle do carrapato. Estudos demonstraram que *Melinis minutiflora*, *S. scabra* e *S. viscosa* possuem ação repelente e podem causar a morte de larvas do carrapato (FARIAS *et al.*, 1986). A rotação de pastagens é outra prática de manejo que comprovadamente reduz o nível de infestação pelo *B. microplus*, especialmente nas épocas de pico parasitário (NORTON *et al.*, 1983, ELDER *et al.*, 1980).

Vários patógenos tem sido estudados no controle biológico de pestes, SAMISH *et al.* (2004) relataram a existência de 96 ingredientes ativos baseados em microorganismos. Porém, apenas algumas espécies foram avaliadas contra carrapatos, sendo que os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* tem sido os mais estudados e parecem os mais promissores (SAMISH *et al.*, 2004). O *M. anisopliae*, um deuteromiceto entomopatogênico, é altamente patogênico para carrapatos *Ixodes scapularis* (ZHIOUA *et al.*, 1997) e *B. microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000). No Brasil, já foram encontrados isolados de *M. anisopliae* infectando naturalmente o *B. microplus* (DA COSTA *et al.*, 2002). Avaliação *in vitro* de 12 isolados de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* mostrou que existem isolados mais patogênicos e que podem causar morte de até 100 % dos carrapatos infectados *in vitro*, dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada (FRAZZON *et al.*, 2000; BITTENCOURT *et al.*, 1999). Outros estudos demonstraram que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* induziram uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30 % em *Rhipicephalus appendiculatus* adultos alimentados em coelhos, enquanto que *M. anisopliae* induziu mortalidade de 37 % em *Amblyomma variegatum* adultos. É interessante ressaltar que estes fungos não perdem sua capacidade de infecção sobre o carrapato quando são incubados com acaricida por mais de 5 dias, mantendo o crescimento e suas características morfológicas normais (KAAYA *et al.*, 1996). BASSO *et al.* (2005) avaliaram o efeito de *M. anisopliae* na população de *B. microplus* e a influência das pastagens *Brachiaria brizantha* e Tifton 85 (*Cynodon* spp.) nessa interação, evidenciando menor número de larvas no Tifton, indicando que o tipo de pastagem favoreceu a ação

do fungo. Esse resultado demonstra que a associação de medidas de controle pode potencializar o resultado do controle biológico. Bactérias, como *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato e também têm sido estudadas no controle biológico. Existem relatos de uma diminuição de até 47 % na ovoposição quando teleóginas de *B. microplus* foram submersas em suspensão de *C. lapagei* (BRUM, 1988). Outros organismos parasitas, tais como nematódeos, tem sido também avaliados como ferramentas no controle biológico de carrapatos, já que têm se mostrados eficientes no controle de insetos (SAMISH & GLAZER, 2001).

Outra estratégia envolvendo controle biológico é a utilização de compostos naturais como pesticidas. DAVEY *et al.* (2001) testaram em bovinos diferentes concentrações de “spinosad”, um acaricida natural de *Sacharopolyspora spinosa* (actinomiceto), obtendo uma drástica redução no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade do *B. microplus*. O extrato de *Sapindus saponaria*, uma árvore rica em saponinas e encontrada nos EUA, México, Argentina e Brasil, foi testado *in vitro* contra larvas de *B. microplus*, demonstrando excelente ação larvicida (FERNANDES *et al.*, 2005). Resultado semelhante foi obtido com óleo essencial extraído de 3 espécies de *Eucalyptus* (CHAGAS *et al.*, 2002).

1.3.3. Controle imunológico

O controle de ectoparasitas através de vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas e torna-se cada vez mais importante como alternativa ao

uso de pesticidas, tóxicos para o homem e o ambiente. Aliado a isso, o rápido desenvolvimento da biotecnologia tem permitido a identificação de novos antígenos e o melhor entendimento das relações parasita-hospedeiro (WILLADSEN, 2001; WILLADSEN, 2006). Segundo este autor, o protótipo de vacinas comerciais contra qualquer espécie de carrapato possui três etapas básicas: a identificação de antígenos protetores; a produção efetiva dessas proteínas como antígenos recombinantes (economicamente viável); e a formulação de uma vacina com antígenos capazes de estimular uma resposta imunológica efetiva contra o carrapato (WILLADSEN, 2001).

O conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro é fundamental para o desenvolvimento de vacinas. Quando infestado pelo *B. microplus* os bovinos apresentam os dois tipos de resposta imunológica: resposta inata e resposta adquirida (WIKEL & BERGMAN, 1997); envolvendo células apresentadoras de antígenos, citocinas, linfócitos B e T, anticorpos, granulócitos, entre outras células e moléculas (WIKEL, 1996). Os carrapatos, por sua vez, desenvolveram ao longo de sua evolução maneiras de evadir ou suprimir respostas imunes do hospedeiro. Um claro exemplo dessa adaptação é a saliva dos artrópodos hematófagos, que contém moléculas anti-hemostáticas, vasodilatadoras, antiinflamatórias e imunomoduladoras, facilitando o processo de alimentação e transmissão de patógenos (RIBEIRO, 1989; NUTTALL & LABUDA, 2004). Essa imunomodulação é particularmente importante para os carrapatos que permanecem se alimentando no hospedeiro por vários dias, como é o caso do *B. microplus* (WIKEL & BERGMAN, 1997), e consegue inibir respostas humorais, ativação do sistema complemento, proliferação de linfócitos T,

produção de citocinas e mediadores químicos como histamina e serotonina (VALENZUELA, 2004; BROSSARD & WIKEL, 2004).

Entretanto, a existência de bovinos com maior grau de resistência ao *B. microplus* e a diminuição da susceptibilidade após infestações sucessivas indicam a capacidade dos bovinos em desenvolver uma resposta imunológica naturalmente adquirida contra o parasita, e foram as bases que justificaram a investigação da vacinação como método de controle (WILLADSEN, 2004). Dois experimentos com transferência passiva de imunidade de animais resistentes para animais suscetíveis também foram importantes na fundamentação do controle imunológico. Apesar do limitado grau de proteção, ROBERTS & KERR (1976) demonstraram transferência passiva de imunidade através da transferência de soro de bovinos resistentes ao *B. microplus* para bovinos sensíveis, confirmando o envolvimento de anticorpos na resistência adquirida. Outro estudo demonstrou a importância dos linfócitos na resposta adquirida contra *Dermacentor andersoni*, através da transferência de células de linfonodo de cobaias resistentes para suscetíveis (WIKEL & ALLEN, 1976). Bovinos infestados naturalmente com carrapatos desenvolvem linfócitos T e B de memória, que permitem uma resposta mais eficiente em futuras infestações (WIKEL, 1996). Apesar da importância dos linfócitos T na indução e manutenção de uma resposta eficaz ser bem definida, ainda não foi elucidado qual a importância de cada tipo de resposta (celular ou humoral) para a proteção contra o carrapato (WIKEL & BERGMAN, 1997; WILLADSEN, 2004). Acredita-se que essa resistência imunológica ao carrapato seja pela ação de anticorpos, complemento ou reações de hipersensibilidade (VALENZUELA, 2004). Outros

estudos sugerem a importância dos anticorpos. KASHINO *et al.* (2005) avaliaram o padrão de resposta humoral em bovinos parcialmente resistentes (raças zebuínas) e suscetíveis (raças européias) à infestação por *B. microplus*, encontrando maiores níveis de IgG anti-saliva em animais da raça Nelore (zebuínos) comparado a bovinos da raça Holandesa e Aberdeen (européias).

Confirmada a validade da fundamentação para a possibilidade de indução de uma resposta imunológica protetora, os trabalhos foram direcionados para pesquisa de antígenos com potencial protetor; constituindo-se no maior desafio para o desenvolvimento de vacinas contra carrapatos, e que ainda hoje é objeto de pesquisa de vários grupos. Os antígenos de carrapatos foram divididos em dois grupos: 1. Antígenos naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante a fase parasitária, proteínas da saliva por exemplo; 2. Antígenos ocultos, aqueles que não entram em contato com o hospedeiro (WILLADSEN & KEMP, 1988). Inicialmente as pesquisas concentraram-se nos antígenos ocultos e mais recentemente passaram a investigar antígenos expostos, tendo como alvo moléculas envolvidas na interação parasita-hospedeiro (WILLADSEN, 2004; NUTTALL & LABUDA, 2004).

A teoria dos "antígenos ocultos" possui duas implicações, a primeira, positiva, de que esses antígenos podem aumentar a resposta protetora, tendo em vista que são moléculas desconhecidas do sistema imune do hospedeiro e, portanto os parasitas não desenvolveram mecanismo de evasão para a resposta imune do hospedeiro. A segunda implicação, negativa, é a necessidade de revacinação para manutenção do status protetor, já que na infestação natural esses antígenos não entram em contato com o hospedeiro (WILLADSEN, 2004).

O controle imunológico teve grande impulso com a identificação, em 1986, de um antígeno oculto presente no intestino do *B. microplus* e chamado de Bm86 (WILLADSEN *et al.*, 1988). A Bm86 é uma glicoproteína capaz de induzir resposta imunológica em bovinos imunizados, sendo a base de duas vacinas comerciais lançadas no mercado: a TickGard, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. As duas vacinas são produzidas em sistema heterólogo, porém, a proteína da TickGard é obtida em *E. coli* e a da Gavac em *Pichia pastoris*. Embora essas vacinas estejam comercialmente disponíveis, elas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas (WILLADSEN *et al.*, 1996, JONSSON *et al.*, 2000). O grupo australiano descreveu e avaliou um segundo antígeno oculto, denominado Bm91, que em associação com a Bm86 aumenta a eficácia da vacinação (RIDING *et al.*, 1994, WILLADSEN *et al.*, 1996).

Resultados parcialmente efetivos com diferentes antígenos geraram confiança sobre a viabilidade técnica de desenvolvimento de uma vacina. Todavia, mesmo diante do lançamento de vacinas contra carrapato no mercado de alguns países, é consenso entre as empresas farmacêuticas veterinárias, bovinocultores, técnicos e cientistas que ainda não foi desenvolvida uma vacina com possibilidades de substituir o atual uso de acaricidas. Embora os antígenos ocultos sejam a base das vacinas comerciais e tenham sido estudados em outros ectoparasitas, como *Lucilia cuprina* e *Pediculus humanus* (TRIMNELL *et al.*, 2002), experimentos com antígenos naturalmente expostos ao sistema imunológico do hospedeiro associado a antígenos ocultos, demonstram o

potencial da associação de diferentes alvos em uma mesma vacina (TRIMNELL *et al.*, 2002).

1.4. A proteína *Boophilus* *Yolk pro-Cathepsin* (BYC)

A BYC é uma glicolipoproteína com massa molecular de aproximadamente 54 kDa, detectada em ovos embrionários de *B. microplus* (LOGULLO *et al.*, 1998). A BYC é uma aspartico proteinase sintetizada no corpo gorduroso e intestino, secretada para a hemolinfa e captada pelo ovócito em crescimento e representa entre 5-8 % das proteínas do ovo, sendo ativada por proteólise limitada durante a embriogênese, onde parece atuar sobre a degradação da vitelina, a principal proteína de reserva dos ovos do carrapato (LOGULLO *et al.*, 1998). Essa participação na degradação da vitelina foi recentemente confirmada *in vitro*, demonstrando a importância dessa enzima no processo de embriogênese (ABREU *et al.*, 2004). Bovinos imunizados com BYC produzem imunoglobulinas que apareceram circulantes na hemolinfa de carrapatos que parasitaram estes animais. As imunoglobulinas circulantes na hemolinfa mantiveram sua atividade biológica, medida pela capacidade de ligação ao antígeno correspondente, o que indica que os anticorpos podem atravessar o epitélio intestinal, e possivelmente reagir com antígenos localizados nos tecidos do meio interno do carrapato (DA SILVA VAZ *et al.*, 1996). Esses dados foram reforçados pelos resultados da inoculação de teleóginas com o anticorpo monoclonal BrBm5 (anti-BYC). Este monoclonal reduz a taxa de sobrevivência das fêmeas entre 5,4 % e 60 % e o peso de ovos entre 2,5 % e 52 %, respectivamente, para dose de 10 µg e 50 µg, demonstrando que os efeitos são dependentes da concentração de anticorpos

inoculados (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998). Quando bovinos imunizados com BYC são desafiados com larvas infestantes há redução no número de teleóginas, capacidade de postura e na fertilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14 % e 36 % em dois experimentos independentes. Os níveis de anticorpos declinam gradualmente após a infestação e respondem positivamente a uma dose de reforço (100 µg), aplicada 11 meses após a infestação, indicando a existência de memória imunológica para esse antígeno (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998).

1.5. Outros antígenos de *B. microplus*

A identificação de novas moléculas e suas funções biológicas representam um campo fértil para o conhecimento dos mecanismos de interação parasita-hospedeiro e para obtenção de novos antígenos com potencial protetor. Além dos antígenos descritos anteriormente, várias moléculas do *B. microplus* já foram identificadas e caracterizadas.

Inibidores de tripsina (BmTIs) foram detectados em diferentes fases de desenvolvimento do *B. microplus* e concentrações variáveis, indicando um possível papel na interação parasita-hospedeiro. Esses BmTIs, purificados de larvas, tiveram sua atividade inibitória para tripsina comprovada através de zimograma reverso e foram usados como antígeno para imunização de bovinos (ANDREOTTI *et al.*, 2002). Dezesesseis bovinos nelore, com 6 meses de idade, receberam 3 doses de 100 µg de BmTIs associado a adjuvante de Freund e foram desafiados com 20.000 larvas de *B. microplus*. Os níveis de IgG anti BmTIs, monitorados por ELISA, tiveram seu pico 40 dias após a primeira imunização (título 1:8000) e apresentaram diminuição após a infestação, atingindo

50 % do título máximo 3 meses após o desafio. A ausência de anticorpos anti-BmTIs nos bovinos controles, sugere que esse antígeno não é reconhecido na infestação natural. Os bovinos imunizados apresentaram redução de 67,9 % no número total de carrapatos, 71,3 % no peso total de ovos e 69,5 % no peso total das fêmeas ingurgitadas, quando comparados aos bovinos controles. Os demais parâmetros (peso dos ovos/número de carrapatos, peso das fêmeas ingurgitadas/animal, peso dos ovos/peso das fêmeas ingurgitadas) não tiveram diferenças significativas em relação ao grupo controle. A eficácia total da vacinação com BmTIs foi de 72,8 % (ANDREOTTI *et al.*, 2002).

O potencial imunogênico da vitelina, principal proteína de reserva do ovo, foi avaliado em experimentos de imunização, usando ovinos como modelo experimental (TELLAM *et al.*, 2002). A espécie ovina tem sido utilizada como modelo para identificação e avaliação de novos antígenos de *B. microplus*. No referido estudo, foram avaliadas duas glicoproteínas derivadas do complexo vitelina, uma de 87 kDa (VIT87) e outra de 80 kDa (GP80), purificadas a partir de ovos e larvas, respectivamente. VIT 87 e GP80 foram idênticas em no mínimo 11 resíduos de aminoácidos na extremidade amino-terminal, demonstrando serem altamente relacionadas, porém não idênticas (TELLAM *et al.*, 2002). Ovinos imunizados com duas doses de 500 µg de VIT87 ou 80 µg de GP80 foram desafiados com 10 fêmeas e 10 machos de carrapatos adultos e monitorados quanto ao número de fêmeas fixadas, número de fêmeas ingurgitadas, percentual de fêmeas danificadas, peso das fêmeas recuperadas e a taxa de conversão de ovos. A eficácia global da imunização, mensurada pela redução no número de larvas após um ciclo completo, foi de 68 % com VIT87 e 66 % com GP80. No

mesmo estudo, os autores relataram a avaliação de uma GP80 expressa em *E. coli*. Entretanto, os resultados obtidos em ovinos imunizados com a proteína recombinante não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Esse resultado pode estar relacionado a ausência de glicosilação ou a conformação incorreta da proteína recombinante obtida em *E. coli* (TELLAM *et al.*, 2002). Tendo em vista que os antígenos estudados até o momento são glicoproteínas, a ausência de glicosilação das proteínas heterólogas obtidas em sistema procariota é um problema potencial no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra o *B. microplus*. Porém, essa dificuldade pode ser contornada pela utilização de um sistema de expressão eucariota (RODRIGUEZ *et al.*, 1994).

Em outro estudo baseado no antígeno Bm86, foram avaliados três peptídeos sintéticos derivados dessa glicoproteína de intestino (PATARROYO *et al.*, 2002). A partir da avaliação de algumas propriedades da proteína, como potencial hidrofóbico e hidrofílico, foram definidos três possíveis determinantes imunogênicos com 14-15 aminoácidos. Vinte bovinos da raça Jersey com idade entre 8 e 10 meses foram divididos em 4 grupos e imunizados com os peptídeos sintetizados. Cada grupo foi tratado com 3 doses de um dos peptídeos (2 mg) associado a 1,5 mg de saponina, o grupo controle recebeu apenas adjuvante. Vinte e um dias após a última dose cada animal foi infestado com 1.500 larvas de *B. microplus*. Anticorpos (IgG) gerados contra os peptídeos sintéticos atingiram títulos entre 400 e 2.400, obtidos após 2 ou 3 imunização e reconheceram a proteína Bm86 *in situ*, especialmente no interior dos vacúolos digestivos. Os resultados da infestação experimental demonstraram uma eficácia de 72 %, 81 %

e 36 % nos bovinos imunizados com peptídeo A (SBm4912), B (SBm7462) e C (SBm19733), respectivamente (PATARROYO *et al.*, 2002).

Além dos antígenos testados em experimentos de vacinação e desafio com larvas de *B. microplus*, abordados anteriormente, várias moléculas envolvidas na fisiologia do carrapato e sua interação com o hospedeiro tem sido descritas por diversos grupos de pesquisa.

BRAZ *et al.* (1999), demonstraram que o *B. microplus* não sintetiza heme, obtendo da hemoglobina do hospedeiro o heme necessário para o seu desenvolvimento. Como consequência disso, o carrapato bovino desenvolveu, ao longo de sua evolução, mecanismos para obtenção e reciclagem de heme. A existência destes mecanismos foi comprovada pela purificação e caracterização de uma aspártico proteinase ligadora de heme (SORGINE *et al.*, 2000). Esta proteína, denominada THAP (Tick Heme-binding Aspartic proteinase) foi o primeiro relato de uma proteinase capaz de ligar heme e ter sua atividade regulada por esta molécula. Aparentemente, o substrato natural dessa proteína é a vitelina, que no caso do carrapato, também é uma heme proteína. A THAP apresenta um único sítio de ligação de heme, distinto do sítio catalítico, e que reconhece os resíduos de ácido propiônico laterais do anel porfirínico. A adição de heme ao meio de incubação inibe a hidrólise da vitelina pela THAP, demonstrando que a enzima é regulada pela disponibilidade de heme. Essa regulação é um provável mecanismo de controle do estresse oxidativo gerado pela degradação de heme (SORGINE *et al.*, 2000). Experimentos *in vitro* para mensurar a capacidade de ligação de heme a vitelina, demonstraram que cada molécula de vitelina é capaz de ligar até 31 moléculas de heme, reforçando a

teoria de controle do estresse oxidativo (LOGULLO *et al.*, 2002). No mesmo estudo, os autores apresentaram evidências de que a vitelina é o principal reservatório de heme que, além de fornecer heme para o desenvolvimento embrionário durante sua degradação, liga-se a qualquer molécula de heme livre que exceda a quantidade necessária para o desenvolvimento embrionário (LOGULLO *et al.*, 2002). A principal proteína da hemolinfa do *B. microplus*, uma lipoproteína chamada HeLp (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2000) também está envolvida nos mecanismos do heme, atuando como uma partícula antioxidante contra os danos induzidos por heme (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2004).

Uma cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE) foi purificada e caracterizada a partir de ovos de *B. microplus* (SEIXAS *et al.*, 2003). Essa enzima é naturalmente associada a vitelina, sendo ativada por acidificação. Os ensaios de atividade demonstraram atividade da VTDCE frente a vários substratos sintéticos, além de hemoglobina, albumina, gelatina e vitelina, este último sendo seu provável substrato natural. Essa atividade foi demonstrada em larvas não alimentadas, ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas, sugerindo um papel na embriogênese do carrapato bovino (SEIXAS *et al.*, 2003). Assim como a BYC, o envolvimento na embriogênese associado a capacidade imunogênica fazem dessa cisteíno endopeptidase um antígeno potencial, que poderia ser utilizado em associação com a BYC (SEIXAS *et al.*, 2003). Anteriormente, uma cisteíno endopeptidase recombinante já havia sido obtida de uma biblioteca de cDNA de larva de carrapato utilizando oligonucleotídeos projetados a partir de seqüências encontradas no sítio ativo de cisteíno proteinases (RENARD *et al.*, 2000). A expressão do clone em *E. coli* permitiu a obtenção da proteína

recombinante (BmCL1), que foi capaz de hidrolisar diferentes substratos sintéticos assim como, hemoglobina, gelatina e vitelina, com atividade ótima em pH ácido. Análises por RT-PCR demonstraram que o gene é expresso no estágio larval do carrapato (RENARD *et al.*, 2000). A proteína recombinante também foi utilizada para obtenção de anticorpo policlonal, que permitiram a localização desta proteína em larvas, partenóginas e teleóginas, através de Western blots. Em experimento de imunolocalização, a enzima foi detectada em células secretórias do intestino. Baseados nesses achados, os autores sugerem que a BmCL1 pode estar envolvida na degradação de hemoglobina no intestino de *B. microplus* (RENARD *et al.*, 2002).

Uma calreticulina (CRT), proteína que se liga a cálcio encontrada em um grande número de espécies e em todas as células nucleadas de mamíferos (MICHALAK *et al.*, 1992) foi identificada e caracterizada em *B. microplus* (FERREIRA *et al.*, 2002a). Suas possíveis funções incluem estocagem de cálcio, mediação da função de integrinas, ligação de C1q, lectina extracelular, chaperonina, além de inibir a expressão gênica regulada por esteróides (COPPOLINO & DEDHAR, 1998). No carrapato *Amblyomma americanum* foi demonstrado a secreção de calreticulina pela saliva, sendo sugerido que atue modulando o sistema imune e/ou hemostase do hospedeiro (JAWORSKI *et al.*, 1995). Níveis de anticorpos contra essa proteína podem estar diretamente relacionados com índices de ingurgitamento (SANDERS *et al.*, 1998; SANDERS *et al.*, 1999). Uma calreticulina de *B. microplus* recombinante (rBmCRT), expressa em *E. coli*, não foi imunogênica para bovino e soro de bovinos naturalmente infestados também não reconheceram a rBmCRT (FERREIRA *et al.*, 2002a).

A paramiosina, uma proteína de 97 kDa, foi identificada e localizada em vários invertebrados, incluindo artrópodes, moluscos e nematódeos (MAROTO *et al.*, 1995). A função da paramiosina em músculo de invertebrados não é totalmente conhecida. Experimentos de transferência passiva de anticorpos anti-paramiosina de *Schistosoma* demonstraram atividade protetora, estimulando a investigação da paramiosina como componente de uma vacina para esquistossomose (GOBERT, 1998). Outra observação interessante é de que a paramiosina inibe ativação de complemento *in vitro*, sugerindo que esta molécula possa estar atuando como imunomoduladora da resposta do hospedeiro (LACLETTE *et al.*, 1992). O cDNA de uma paramiosina de *B. microplus* (BmPRM) foi isolado, caracterizado e expresso em *E. coli*, codificando uma proteína de 102 kDa (FERREIRA *et al.*, 2002b). Esta BmPRM recombinante ligou-se a IgG e ao colágeno, sugerindo o envolvimento dessa proteína na modulação da resposta imunológica do hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2002b).

Uma Glutathione S-transferase (GST) foi isolada de larvas (HE *et al.*, 1999) e de glândula salivar de *B. microplus* (ROSA DE LIMA *et al.*, 2002). Essas enzimas já foram identificadas em animais e vegetais e estão relacionadas a várias funções, como transporte intracelular, participação em processos digestivos, síntese de prostaglandinas e, principalmente, na detoxificação de substâncias tóxicas e na proteção ao estresse oxidativo (LEE *et al.*, 2002; ROSA DE LIMA *et al.*, 2002). Altos níveis de expressão de GST tem sido relacionado a resistência a inseticidas em vários organismos (KAWALEK *et al.*, 1984), além de estar associada a reações alérgicas mediadas por IgE (O'NEILL *et al.*, 1994). Em *B. microplus* ainda não foi comprovado correlação entre expressão de GST e

resistência frente aos acaricidas, mas acredita-se que essa enzima esteja envolvida nos mecanismos de resistência às drogas.

Uma proteína inibidora de trombina, com massa molecular de 60 kDa, foi purificada da saliva de *B. microplus* e teve sua atividade anticoagulante demonstrada (HORN *et al.*, 2000). Os resultados obtidos, demonstraram que a saliva do carrapato é capaz de inibir tanto a via intrínseca como extrínseca da coagulação, inibindo a atividade amidolítica da trombina, um fator comum as duas vias. A identificação de anticoagulantes na saliva do carrapato confirma a existência de mecanismos específicos que permitem o hematofagismo e podem contribuir para o controle do parasitismo (HORN *et al.*, 2000).

Após evidenciar a presença de atividade cininase em extrato de glândula salivar de *B. microplus*, BASTIANI *et al.*(2002) purificaram e caracterizaram essa enzima, que foi chamada de Bookase. Os ensaios de atividade demonstraram que a Bookase é uma metaloendopeptidase ativada por tiol capaz de hidrolizar Bradicinina, um peptídeo biologicamente ativo importante no controle da pressão sanguínea e na resposta inflamatória. Porém, essa atividade cininase não foi observada na saliva de teleóginas parcialmente ingurgitadas. Baseados nisso, os autores sugerem que o papel fisiológico da Bookase pode estar associado a estágios iniciais do parasitismo, como na saliva de larvas recém fixadas (BASTIANI *et al.*, 2002).

Os estudos realizados até o momento justificam a confiança sobre a viabilidade de um método alternativo para o controle do carrapato *B. microplus*, através do desenvolvimento de uma vacina e ou de uma estratégia de controle biológico. É consenso, porém, que uma vacina com reais possibilidades de

substituir totalmente o uso de acaricidas ainda não está disponível, tornando imprescindível a busca de novos antígenos e o estudo e aperfeiçoamento dos antígenos já identificados, a fim de concretizar a meta de uma vacina técnica e economicamente eficiente contra o *B. microplus*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

- Produzir a proteína *Boophilus Yolk pro-Cathepsin* recombinante (BYCr) em sistema heterólogo;
- Avaliar a capacidade protetora da BYCr contra o *B. microplus*, através da imunização e desafio de bovinos.

2.1. Objetivos Específicos

- 1- Sub-clonagem do cDNA da BYC em vetores de expressão em procarioto;
- 2- Expressão em sistema heterólogo e purificação de uma BYC recombinante (BYCr);
- 3- Imunização de bovinos com BYCr e desafio com *B. microplus*;
- 4- Avaliação da resposta imunológica induzida por BYCr em bovinos;
- 5- Avaliação do efeito protetor contra *B. microplus* induzido pela vacinação com BYCr.

CAPÍTULO I

Artigo publicado na revista *Protein Expression and Purification*.

Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies.

Alexandre T. Leal, Paula C. Pohl, Carlos Alexandre S. Ferreira, Maria Clara L. Nascimento-Silva, Marcos Sorgine, Carlos Logullo, Pedro L. Oliveira, Sandra E. Farias, Itabajara Da Silva Vaz Jr, Aoi Masuda. *Protein Expression and Purification*, 45: 107-114, 2006.



Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies

Alexandre T. Leal^a, Paula C. Pohl^a, Carlos A.S. Ferreira^b, Maria C.L. Nascimento-Silva^c,
Marcos H.F. Sorgine^c, Carlos Logullo^d, Pedro L. Oliveira^c, Sandra E. Farias^a,
Itabajara da Silva Vaz Jr.^{a,e}, Aoi Masuda^{a,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre-RS 91501-970, Brazil

^b Laboratório de Imunologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre-RS, Brazil

^c Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

^d Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes-RJ, Brazil

^e Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

Received 11 April 2005, and in revised form 8 July 2005

Available online 8 August 2005

Abstract

The tick *Boophilus microplus* is a bovine ectoparasite present in tropical and subtropical areas of the world and the use of vaccines is a promising method for tick control. BYC is an aspartic proteinase found in eggs that is involved in the embryogenesis of *B. microplus* and was proposed as an important antigen in the development of an anti-tick vaccine. The cDNA of BYC was amplified by PCR and cloned for expression in two forms with and without thioredoxin fusion protein (Trx), coding recombinant proteins named rBYC-Trx and rBYC, respectively. Expression, solubility, and yields of the two forms were analyzed. The recombinant proteins were expressed in inclusion bodies (IBs) and three denaturant agents (*N*-lauroyl sarcosine, guanidine hydrochloride, and urea) were tested for IBs solubilization. The *N*-lauroyl sarcosine solubilized 90.4 and 92.4% of rBYC-Trx and rBYC IBs, respectively, and was the most efficient denaturant. Two recombinant forms were affinity-purified by Ni²⁺-Sepharose under denaturing conditions. After dialysis, the yield of soluble protein was 84.1% for r-BYC-Trx and 5.9% for rBYC. These proteins were immune-reactive against sera from rabbit, mouse, and bovine previously immunized with native BYC, which confirms the antigenicity of the recombinant BYCs expressed in the *Escherichia coli* system.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Boophilus microplus*; BYC; Thioredoxin; Inclusion bodies; *N*-Lauroyl sarcosine; Vaccine

The tick *Boophilus microplus* is an important cattle ectoparasite in South and Central Americas, Asia, Africa, and Oceania [1]. This ixodidae tick causes considerable economical losses to cattle breeding, either directly, due to the blood-sucking deleterious effects which cause losses in animal production, or indirectly by increasing pest control costs. Besides, *B. microplus* is a vector of diseases such as anaplasmosis and babesiosis.

Conventional tick control methods are based mainly on the use of acaricides, in spite of the high costs and the rapid appearance of resistance in the tick population [2]. The presence of chemical residues in meat and milk emphasizes the need for novel control methods [3]. Therefore, efforts are being made to develop new methodologies to monitor the appearance of acaricide resistance [4] as well as to promote alternative approaches to tick control such as vaccines [5–9] and biological control [10–12]. An anti-tick vaccine is considered one of the most promising methods; however, its development still

* Corresponding author. Fax: +55 51 3316 7309.

E-mail address: aoi@cbiot.ufrgs.br (A. Masuda).

depends on the identification and characterization of one or more protective tick antigens [13,14]. The success of this strategy depends on the identification and cloning of key tick molecules and the characterization of their roles in arthropod physiology [14,15].

The *Boophilus* yolk pro-cathepsin (BYC)¹ is an aspartic proteinase present in *B. microplus* eggs [16]. The 54 kDa BYC is activated *in vitro* by auto-proteolysis when incubated in acidic pH, and converted to a 47-kDa polypeptide that can be detected *in vivo*, during embryogenesis. Recently, the role of BYC was demonstrated in the degradation of vitellin (VT), the major yolk protein, confirming its importance in embryogenesis [17]. Cattle immunized with purified BYC showed an immune response partially protective against tick infestation that was mostly due to an increase in the number of sterile eggs [7]. These data support BYC as an antigen candidate to design an anti-tick vaccine. Aspartic proteinases produced in *Escherichia coli* are usually expressed in inclusion bodies (IBs), and fusion proteins as thioredoxin (Trx) [18,19] or maltose-binding protein (MBP) have been used in order to improve solubility of recombinant proteins [20]. In the present study, the BYC cDNA was cloned in a vector with thioredoxin and His-tag as fusion protein and in other vector only with His-tag at the carboxy-terminus of the protein. Therefore, we report the expression of the two recombinant forms of BYC (rBYC) in *E. coli* as inclusion bodies, and the analysis of various denaturants to solubilize the IBs in order to purify rBYC by affinity Ni²⁺-Sepharose chromatography. We also report the efficiency of solubility and the recognition of rBYC not fused and fused with Trx by hyperimmune sera raised in animals immunized with the native BYC protein.

Materials and methods

Cloning of BYC

The cDNA encoding BYC was previously cloned by RT-PCR from fat body of engorged tick females (Maria Nascimento-Silva, personal communication). According to the amino acid sequencing of BYC [16] the cDNA was incomplete, without the coding sequence for the six N-terminal amino acids (GenBank Accession No. AY966003). The full coding sequence was restored by PCR and the complete cDNA was cloned into two expression vectors, pET-32b (Novagen), which produces a recombinant protein fused with histidine tagged thio-

redoxin protein (Trx), and pET-19b (Novagen), which produces a recombinant protein fused with a histidine tag. For cloning into pET-32b vector via *NcoI* and *XhoI* sites, the following primers were used: sense, *tatcaattccatggcaaaaatt cgcattccgcttcgcaaggatcgattattatgtc*; antisense, *atcagggc tcgagtttagtacacgattggcgcg* (*NcoI* and *XhoI* restriction sites are in italics, the bases coding the missing amino acids are in bold). PCR amplification with *Elongase* polymerase (Invitrogen) was performed using 10 ng of template plasmid (pT7-Blue/BYC). Reaction conditions were: an initial 5-min denaturation at 94 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 54 °C, 60 s at 68 °C, and a 5-min final extension at 68 °C. The amplified DNA (1106 bp) sequence encoding the exon of BYC was digested with *NcoI* and *XhoI*, and cloned into plasmid pET-32b at *NcoI/XhoI* restriction sites downstream to the gene of thioredoxin (Trx) and histidine tag to give the pET-32b/BYC plasmid. For ligation, digested insert and vector were purified in a MicroSpin S-400 HR column (Amersham Biosciences) and ligated with T4 DNA ligase (Invitrogen). After the cloning into pET-32b, the BYC cDNA was subcloned into pET-19b using the following primers: sense, *tatcaattccatggcaaaaattcgcattc*; antisense, *atcagggctcgagtttagtgggtgggtgggtgggttacacgattggcggggtg* (*NcoI* and *XhoI* restriction sites are in italics, the encoding histidine tag included into antisense primer are in bold). Reaction conditions were: an initial 5-min denaturation at 94 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55.9 °C, 60 s at 68 °C, and a 5-min final extension at 68 °C. The 1123 bp PCR product and plasmid were digested with *NcoI* and *XhoI*, purified in MicroSpin S-400 column (Amersham Biosciences), and ligated with T4 DNA ligase (Invitrogen) to give pET-19b/BYC plasmid. The resulting plasmids pET-32b/BYC and pET-19b/BYC, coding the rBYC-Trx and rBYC proteins, respectively, were transformed by electroporation into XL1 Blue *E. coli* cells (Novagen) and selected in Luria-Bertani (LB) medium containing ampicillin (100 µg ml⁻¹). The BYC cDNA integrity was confirmed by sequencing the plasmid DNA.

Expression and preparation of inclusion bodies

The recombinant plasmids pET-32b/BYC and pET-19b/BYC were transformed into *E. coli* strain AD494 DES LysS (Novagen) and plated onto LB agar plates containing ampicillin. Single colonies were inoculated into 2.5 ml SOB medium [21] containing ampicillin (100 µg ml⁻¹) and grown overnight at 37 °C with shaking at 180 rpm. The overnight cultures were harvested by centrifugation, resuspended in fresh medium, and used to inoculate 500 ml of SOB medium in 2-L flasks. These flasks were incubated at 37 °C with shaking at 180 rpm until an OD₆₀₀ of 0.5 was reached. For induction, isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG, Invitrogen) was added to a final concentration of 0.4 mM and the culture was

¹ Abbreviations used: BYC, *Boophilus* yolk pro-cathepsin; VT, vitellin; IBs, inclusion bodies; Trx, thioredoxin; MBP, maltose-binding protein; LB, Luria-Bertani; IPTG, isopropylthio-β-D-galactoside; GuHCl, guanidine hydrochloride; ORFs, open reading frames; CMC, critical micelle concentration.

grown at 30 °C for 17 h. The cell culture was centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C and the cell pellet was resuspended in phosphate buffer (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4). For cell lysis, the suspension was frozen, thawed out and sonicated on ice. The protease inhibitor PMSF (1 mM) was added prior to sonication. The soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 10,000g for 10 min at 4 °C. The pellet containing the IBs was resuspended with washing buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 M urea, and 1% Triton X-100, pH 8.0) and centrifuged at 8000g for 10 min at 4 °C. This step was repeated three times.

Solubilization of recombinant proteins

The IBs were treated with three denaturant agents (0.3% *N*-lauroyl sarcosine, guanidine hydrochloride, and urea), as described below. After each denaturant treatment, solubilization yields were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 12% (SDS-PAGE) [22] and protein quantification was determined by the Bradford method [23] with bovine serum albumin as standard.

Solubilization with 0.3% N-lauroyl sarcosine

The washed IBs were denatured and solubilized in lysis buffer A (0.3% *N*-lauroyl sarcosine, 50 mM CAPS buffer, and 0.3 M NaCl, pH 11.0) for 1 h and centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C. The rBYC-Trx and rBYC proteins, which contain His-tag, were affinity-purified by Ni²⁺-Sepharose. In brief, the supernatant was applied to a His Trap HP column (Amersham Biosciences) and the column was then washed with washing buffer A (30 mM imidazole, 0.3% *N*-lauroyl sarcosine, 50 mM CAPS buffer, and 150 mM NaCl, pH 11.0). The proteins were eluted with a serial concentration increase of imidazole (50, 100, 200, and 500 mM) in elution buffer A (0.3% *N*-lauroyl sarcosine, 50 mM CAPS buffer, and 150 mM NaCl, pH 11.0). Eluted fractions were analyzed by 12% SDS-PAGE. The denatured purified proteins in the eluted fractions were dialyzed in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl buffer with gradual pH reduction (pH 10, pH 9, and pH 8). Each dialysis step was performed at 4 °C during 12 h against at least 20× sample volume. Samples at pH 9.0 were collected for SDS-PAGE analysis.

Solubilization with 6 M guanidine hydrochloride and 8 M urea

The washed IBs were denatured and solubilized with lysis buffer B (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 6 M guanidine hydrochloride (GuHCl), and 1 mM β-mercaptoethanol, pH 7.4) for 1 h and centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C. The solubilized proteins

(rBYC-Trx and rBYC) were purified in Ni²⁺-Sepharose column following the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). Purifications were performed under denaturing conditions. Samples were loaded and the columns washed with the same lysis buffer B containing 30 mM imidazole. Proteins of interest were eluted with 100 mM imidazole in elution buffer B (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, and 6 M GuHCl, pH 7.4). The purified proteins were dialyzed against 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl (pH 7.4). Eluted fractions were analyzed by 12% SDS-PAGE. Urea (8 M) was also tested for solubilization of recombinant proteins. Washed IBs were solubilized with lysis buffer C (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, and 8 M urea, pH 7.4) for 1 h at room temperature. The samples were centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C and the soluble fractions were analyzed by 12% SDS-PAGE.

Western blotting with anti-BYC antibody

To verify antigenicity, Western blot assays using serum against native BYC of different species were carried out. The recombinant proteins (rBYC-Trx and rBYC) were separated by 12% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with bovine, rabbit or mouse sera (1:500) previously immunized with native BYC. Anti-IgG species-specific alkaline phosphatase conjugates were used as secondary antibodies and NBT/BCIP (Sigma) were used as substrate.

Results

Cloning of BYC cDNA

The DNA sequence analysis confirmed the deduced sequences of the cloned cDNAs, which possess open reading frames (ORFs) of 1560 bp in pET-32b/BYC, and of 1101 bp in pET-19b/BYC. These ORFs encode to polypeptides with predicted molecular masses of 57,563 Da (rBYC-Trx) and 41,257 Da (rBYC), respectively.

Expression of recombinant proteins

rBYC-Trx and rBYC were detected by 12% SDS-PAGE and immunoblotting against rabbit anti-BYC serum. The apparent molecular masses of rBYC-Trx and rBYC were of approximately 56 and 40 kDa, respectively (Fig. 1). Both supernatant and pellet of cell lysates were tested for the presence of recombinant proteins. As shown in Fig. 1, the majority of the expressed recombinant proteins was present in inclusion bodies. The predicted molecular mass of the BYC amino acid sequence is 40.4 kDa, but the native BYC is

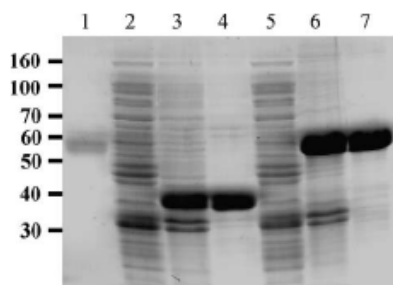


Fig. 1. SDS-PAGE (12% gel performed under reducing conditions) of recombinant BYC proteins in soluble and insoluble fractions of crude extracts stained with Coomassie blue G-250. Samples were lysed with SDS loading buffer and boiled for 5 min. Lane 1, native BYC; lane 2, supernatant of pET-19b/BYC bacterial extract; lane 3, pellet of pET-19b/BYC bacterial extract; lane 4, pET-19b/BYC inclusion bodies after washing; lane 5, supernatant of pET-32b/BYC bacterial extract; lane 6, pellet of pET-32b/BYC bacterial extract; and lane 7, pET-32b/BYC inclusion bodies after washing step. MW marker $\times 10^3$.

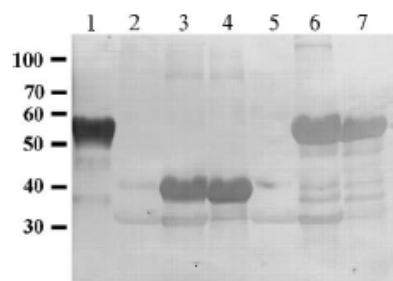


Fig. 2. Western blot of recombinant BYC proteins in soluble and insoluble fractions of crude extracts probed with rabbit BYC antiserum (1:500). Lane 1, native BYC; lane 2, supernatant of pET-19b/BYC bacterial extract; lane 3, pellet of pET-19b/BYC bacterial extract; lane 4, pET-19b/BYC inclusion bodies after washing; lane 5, supernatant of pET-32b/BYC bacterial extract; lane 6, pellet of pET-32b/BYC bacterial extract; and lane 7, pET-32b/BYC inclusion bodies after washing. Alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000) and NBT/BCIP were used. MW marker $\times 10^3$.

a glycoprotein with apparent molecular mass of 54 kDa [16]. The major bands visualized in SDS-PAGE were confirmed as rBYC and rBYC-Trx proteins by Western blotting with rabbit anti-BYC serum and showed apparent molecular masses of 40 and 56 kDa, respectively (Fig. 2).

Solubilization of inclusion bodies

The IBs were partially purified after washing with buffer containing 1 M urea and 1% Triton X-100 (Fig. 1). Three denaturant agents were tested for solubilization of recombinant proteins. The alkalized lysis buffer containing 0.3% *N*-lauroyl sarcosine was the most efficient for rBYC and rBYC-Trx IBs solubilization, as shown in Fig. 3 and Table 1. The highest yield of solubilization

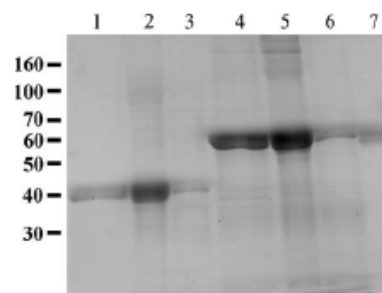


Fig. 3. Solubilization of IBs with three denaturant agents. Samples were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue G-250. Samples were resuspended directly in SDS loading buffer and boiled for 5 min. Lane 1, rBYC 6 M GuHCl treated; lane 2, rBYC *N*-lauroyl sarcosine treated; lane 3, rBYC 8 M urea treated; lane 4, rBYC-Trx 6 M GuHCl treated; lane 5, rBYC-Trx *N*-lauroyl sarcosine treated; and lane 6, rBYC-Trx 8 M urea treated. MW marker $\times 10^3$.

was achieved with *N*-lauroyl sarcosine, which was over 90% for both rBYC-Trx and rBYC (Table 1). Guanidine hydrochloride was also efficient and solubilized approximately 78% for rBYC-Trx and 65% for rBYC (Table 1). The IBs were only partially solubilized in 8 M urea with more than 80% of rBYC and rBYC-Trx proteins still residing in the precipitate after lysate centrifugation. As the recombinant protein-containing IBs were barely solubilized in 8 M urea, further purification was not carried out.

Purification of recombinant proteins

rBYC and rBYC-Trx solubilized with the *N*-lauroyl sarcosine treatment were purified under denaturing conditions using Ni^{2+} -Sephacrose. This one-step purification yielded highly purified rBYC and rBYC-Trx proteins (Fig. 4). The recombinant proteins were eluted with both 50 and 100 mM imidazole, although they showed a higher degree of purity with 100 mM (Figs. 4A and B). The flowthrough was loaded a second time onto Ni^{2+} -Sephacrose to increase the yield of recombinant protein recovery. Purification yields with *N*-lauroyl sarcosine are summarized in Table 2. The IBs solubilized with 6 M GuHCl were also affinity-purified by Ni^{2+} -Sephacrose. However, rBYC and rBYC-Trx re-aggregated and precipitated during dialysis for GuHCl removal (data not shown).

Solubility of purified recombinant proteins

The purified protein was dialyzed for removal of the *N*-lauroyl sarcosine and gradual pH reduction. After each dialysis step (pH 10, pH 9, and pH 8), an aliquot was taken and centrifuged to separate soluble and insoluble fractions. Analysis by SDS-PAGE indicated that

Table 1
Efficiency of solubilization of inclusion bodies containing the recombinant BYC proteins with three denaturant agents

Recombinant protein	Denaturant	Total protein in washed IBs (mg) ^a	Total protein in solubilized IBs ^a	
			(mg)	(%)
rBYC	GuHCl	98	64.3	65.7
	<i>N</i> -Lauroyl sarcosine	98	90.5	92.4
	Urea	98	16.9	17.3
rBYC-Trx	GuHCl	133	104.4	78.5
	<i>N</i> -Lauroyl sarcosine	133	120.2	90.4
	Urea	133	21.0	15.8

^a From 1 L of induced culture.

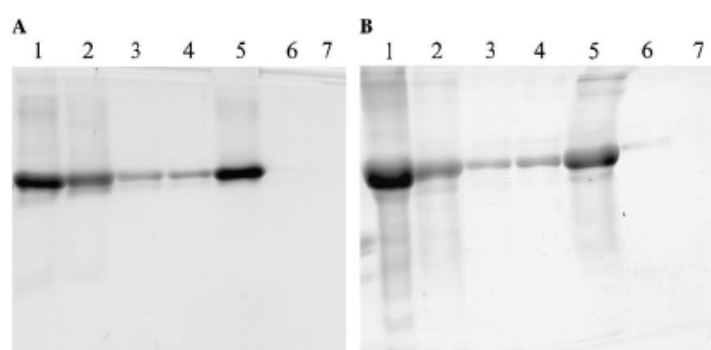


Fig. 4. SDS-PAGE of *N*-lauroyl sarcosine solubilized protein fractions after affinity purification in Ni²⁺-Sepharose. Samples were resuspended directly in SDS loading buffer and boiled for 5 min. (A) rBYC; (B) rBYC-Trx. Lanes 1, solubilized IBs before purification; lanes 2, proteins in the flowthrough fraction; lanes 3, washing fractions with 30 mM imidazole; lanes 4, elution fraction with 50 mM imidazole; lanes 5, elution fraction with 100 mM imidazole; lanes 6, elution fraction with 200 mM imidazole; and lanes 7, elution fraction with 500 mM imidazole. Gel stained with Coomassie blue G-250.

Table 2
Purification and solubility rate of recombinant BYC proteins treated with *N*-lauroyl sarcosine

Recombinant protein	Total protein in solubilized IBs (mg) ^a	Purified protein with His Trap column (mg)	Soluble protein (mg)		Solubility rate pH 8.0 (%)	
			pH 9.0	pH 8.0	From IBs	From purification
rBYC	90.5	78.6	68.7	4.6	5.1	5.9
rBYC-Trx	120.2	64.9	63.0	54.5	45.4	84.1

^a From 1 L of induced culture.

pH reduction was critical for solubility of recombinant proteins, especially rBYC. As shown in Fig. 5, rBYC was almost totally precipitated at pH 8.0 and partially precipitated at pH 9.0. On the other hand, recombinant thioredoxin-fusion protein (rBYC-Trx) remained in solution after *N*-lauroyl sarcosine removal at the pH values tested (Fig. 5). The solubility rates of both recombinant proteins are shown in Table 2.

Western blotting with anti-BYC antibodies

A Western blot with rabbit anti-BYC serum confirmed the expression of the recombinant proteins and indicated its immune-reactivity (Fig. 2). Another indication of antigenicity was the recognition by bovine and

mouse anti-native BYC sera. Sera of bovines immunized with four doses of native BYC [7] also recognized the rBYC and rBYC-Trx, with a somewhat weaker intensity when compared to native BYC, as summarized in Fig. 6. Anti-native BYC mouse serum also recognized the recombinant proteins (Fig. 7). These results demonstrate that the immunogenicity potential was maintained in the rBYC and rBYC-Trx.

Discussion

Our group has characterized three proteinases from *B. microplus* eggs. Two aspartic proteinases named BYC [16] and THAP [24], and one cysteine proteinase [25].

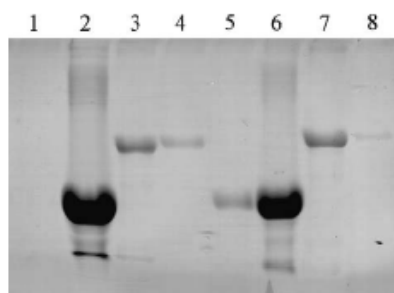


Fig. 5. Solubility of the purified proteins after dialysis. Samples were submitted to SDS-PAGE 12% and were stained with Coomassie blue G-250. Samples were resuspended directly in SDS loading buffer and boiled for 5 min. Lane 1, rBYC supernatant pH 8; lane 2, rBYC pellet pH 8; lane 3, rBYC-Trx supernatant pH 8; lane 4, rBYC-Trx pellet pH 8; lane 5, rBYC supernatant pH 9; lane 6, rBYC pellet pH 9; lane 7, rBYC-Trx supernatant pH 9; and lane 8, rBYC-Trx pellet pH 9.

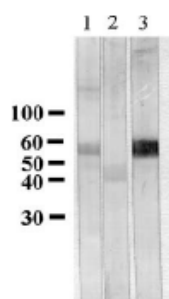


Fig. 6. Western blot of purified BYC and rBYC probed with bovine serum anti-native BYC. Lane 1, rBYC-Trx; lane 2, rBYC; and lane 3, native BYC. Alkaline phosphatase-conjugated anti-bovine IgG (1:5000). MW marker $\times 10^3$.

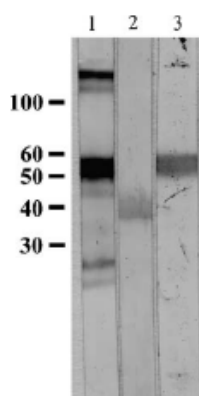


Fig. 7. Western blot of purified BYC and rBYC probed with mouse serum anti-native BYC. Lane 1, rBYC-Trx; lane 2, rBYC; and lane 3, native BYC. Alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (1:5000). MW marker $\times 10^3$.

The most abundant protein (BYC) is the precursor of an aspartic proteinase that is synthesized in the fat body and gut of the tick, secreted to the hemolymph, and

stored in the oocyte [16]. This protease is activated by autoproteolysis under acidic conditions, a process that has been described in other invertebrates where the participation of different classes of acid proteases is also observed in digestion of egg yolk [26–28]. Recently, it was demonstrated (in vitro) that BYC is highly specific for vitellin [17], reinforcing the hypothesis that it plays a key role in the degradation of yolk proteins, an essential process for embryogenesis [16,17]. In previous reports, we demonstrated that cattle vaccination with native BYC induces an humoral response and functional anti-BYC antibodies were observed in the hemolymph of ticks feeding on vaccinated cattle [29], resulting in an overall protection between 14 and 36% of bovines challenged with *B. microplus* larvae. Consistent with the in vitro data, egg fertility and egg laying capacities were the principal parameters affected by immunization [7]. Other authors have provided evidence that anti-tick immunity induced by a cocktail vaccine is more effective as compared to a single antigen vaccine [5,30]. Based on these data we can suggest that BYC is an antigen with potential to become part of a cocktail vaccine against *B. microplus*.

The production of recombinant proteins in heterologous systems is a key process to vaccine development. High expression of foreign proteins in bacteria often results in aggregation and accumulation [31]. This may be due to a protein translation rate that may exceed the cell capacity to fold the newly synthesized proteins [32]. Aspartic proteinases produced in *E. coli* are generally expressed in IBs [20]. Thioredoxin is a small monomer which facilitates the soluble expression and refolding of recombinant proteins [18,19]. To compare the expression of rBYC and the role of a fusion protein in its solubility, BYC cDNA was cloned into two vectors, pET-32b and pET-19b, with and without Trx, respectively. Both expression vectors induced high levels of recombinant BYC expression in the *E. coli* system. However, rBYC accumulated in inclusion bodies independently of vectors and expression conditions tested. One way to overcome the formation of inclusion bodies consists in reducing the protein translation rate by inducing expression at a lower temperature [33]. We tested inductions at 23 and 18 °C, but the lower temperatures had no effect on the expression of soluble rBYC and rBYC-Trx (data not shown).

Guanidine hydrochloride and urea are denaturing agents commonly used for solubilization of proteins expressed in IBs. However, rBYC and rBYC-Trx obtained in IBs were not efficiently solubilized with 8M urea. GuHCl, a strong denaturant, was efficient in rBYC and rBYC-Trx solubilization with yields of 65 and 78%, respectively. GuHCl-solubilized proteins were purified under denaturant conditions in Ni²⁺-Sepharose chromatography (not shown). Both purified proteins were unable to refold efficiently due to aggregation and

precipitation of the proteins once the denaturant was gradually removed by dialysis. Gradual concentration reduction of denaturant agent and co-solvents as glycerol, reduced glutathione, oxidized glutathione, and L-arginine have been used to improve the refolding of recombinant proteins solubilized with GuHCl, but the results are different for each protein [31,34,35,37]. We have not tested these co-solvents in the refolding of rBYC, since *N*-lauroyl sarcosine proved to be a better denaturing agent for rBYC and rBYC-Trx.

N-Lauroyl sarcosine, an anionic denaturant, reduces hydrophobicity due to its capacity to interact with hydrophobic residues, and can be removed by dialysis when its concentration lies below critical micelle concentration (CMC) [35,36]. *N*-Lauroyl sarcosine was highly efficient for rBYC and rBYC-Trx solubilization with yields higher than 90%, the best result among the denaturants tested. The purification with His Trap column (Amersham Biosciences) was performed under denaturant conditions, indicating that the *N*-lauroyl sarcosine did not abolish adsorption of proteins to Ni²⁺ charged resin. The elution profile was not affected by Trx and most of the contents of both recombinant proteins were eluted with 100 mM imidazole and SDS-PAGE analyses showed few contaminating bands (Fig. 4) after a single purification step. The purified proteins were dialyzed for denaturant removal with gradual pH reduction. The Trx fusion partner increased the yield of soluble proteins (rBYC-Trx) after dialysis, which was also influenced by pH. In pH 9.0 solutions, the majority of the recombinant proteins was soluble. However, in pH 8.0 solutions rBYC was almost totally precipitated and rBYC-Trx remained soluble. Therefore, Trx facilitated the recovery of soluble protein after dialysis. The role of Trx and MBP in the increase of solubility during refolding of other recombinant aspartic proteases was previously described [20]. The predicted pI's of rBYC (5.77) and rBYC-Trx (5.36) are similar. Thus, the higher solubility of the rBYC-Trx compared to rBYC is remotely due to differences in the pI's of the two proteins. Sachdev and Chirgwin [20] suggested that during refolding fusion proteins block side-reactions, hence avoiding the aggregation of the recombinant proteins.

The BYC amino acid sequence indicates a molecular mass of 40.4 kDa, whereas the native glycoprotein has a molecular mass of 54 kDa—a difference due to glycosylation and phosphorylation [16]. Therefore, the possible involvement of glycosylation in the antigenicity of rBYC needs to be evaluated. In Western blot, the rBYC and rBYC-Trx were recognized by rabbit anti-BYC serum (Fig. 2). This, associated with Western blot assays with bovine and mouse anti-BYC sera, confirmed the presence of antigenicity for both recombinant forms (rBYC and rBYC-Trx). The recognition of rBYC by hyperimmune sera confirms that the recombinant protein displays epitopes that were immunogenic in the vaccination with

native BYC. This characteristic is of paramount importance for a potential vaccine based on rBYC. However, investigation into the capacity of rBYC to induce protective humoral response in vaccinated bovines is required to authenticate its use as vaccine antigen. In this report, we described a method for expression, solubilization, and dialysis of the aspartic proteinase, a potential candidate to design a *B. microplus* vaccine. The presence of Trx as fusion protein in rBYC increased the solubility after dialysis of the recombinant protein. In addition, the aggregation dependence on pH values of dialysis solutions was demonstrated. This method might be applicable to other recombinant proteins. In this work, we verified that our recombinant proteins showed similar immunological properties as compared to native protein. Therefore, heterologous expression of recombinant protein could provide a valuable resource of BYC, which is a potential candidate as an antigen for multi-component vaccines against *B. microplus*.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, PRONEX, and FAPERGS.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jpep.2005.07.009.

References

- [1] L.A.Y. Johnston, D.H. Kemp, R.D. Pearson, Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations, *Int. J. Parasitol.* 16 (1986) 27–34.
- [2] J. Nolan, Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance, *Vet. Parasitol.* 18 (1985) 155–166.
- [3] S.E. Kunz, D.H. Kemp, Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact, *Rev. Sci. Tech.* 13 (1994) 1249–1286.
- [4] G.D. Baxter, S.C. Barker, Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and organophosphate-resistant cattle ticks, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32 (2002) 815–820.
- [5] G.A. Riding, J. Jarney, R.V. Makenna, R. Pearson, G.S. Cobon, P. Willadsen, A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function, *J. Immunol.* 153 (1994) 5158–5166.
- [6] M. Rodrigues, R. Rubiera, M. Penichet, R. Montesinos, J. Cremata, V. Falcon, G. Sanchez, R. Bringas, C. Cordovés, M. Valdés, R. Leonart, L. Herrera, J. De la Fuente, High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle, *J. Biotechnol.* 33 (1994) 135–146.
- [7] I. Da Silva Vaz Jr., C. Logullo, M. Sorgine, F.F. Velloso, M.F. Rosa de Lima, J.C. Gonzales, H. Masuda, P.L. Oliveira, A. Masuda, Immunization of bovines with an aspartic proteinase

- precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs, Vet. Immunol. Immunopathol. 66 (1998) 331–341.
- [8] R. Andreotti, A. Gomes, K.C. Malavazi-Piza, S.D. Sasaki, C.A. Sampaio, A.S. Tanaka, BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick, Int. Immunopharmacol. 2 (2002) 557–563.
- [9] J.H. Patarroyo, R.W. Portela, R.O. De Castro, J.C. Pimentel, F. Guzman, M.E. Patarroyo, M.I. Vargas, A.A. Prates, M.A. Mendes, Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86), Vet. Immunol. Immunopathol. 88 (2002) 163–172.
- [10] G.P. Kaaya, S. Hassan, Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control, Exp. Appl. Acarol. 24 (2000) 913–926.
- [11] A.P. Frazzon, I. Da Silva Vaz Jr., A. Masuda, A. Schrank, M.H. Vainstein, In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*, Vet. Parasitol. 94 (2000) 117–125.
- [12] G. Gindin, M. Samish, G. Zangi, A. Mishoutchenko, I. Glazer, The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi, Exp. Appl. Acarol. 28 (2002) 283–288.
- [13] J.P. Opdebeeck, Vaccines against blood-sucking arthropods, Vet. Parasitol. 54 (1994) 205–222.
- [14] S. Imamura, I. Da Silva Vaz Jr., M. Sugino, K. Ohashi, M. Onuma, A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine, Vaccine 23 (2005) 1301–1311.
- [15] P. Willadsen, Perspectives for subunit vaccines for the control of ticks, Parasitologia 32 (1990) 195–200.
- [16] C. Logullo, I. Da Silva Vaz Jr., M.H.F. Sorgine, G.O. Paiva-Silva, F.S. Faria, R. Zingali, M. Rosa de Lima, L. Abreu, E.F. Oliveira, E.W. Alves, H. Masuda, J.C. Gonzales, A. Masuda, P.L. Oliveira, Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*, Parasitology 116 (1998) 525–532.
- [17] L.A. Abreu, D. Valle, P.P.A. Manso, A.R. Façanha, M. Pelajo-Machado, H. Masuda, A. Masuda, I.S. Vaz Jr., H. Lenzi, P.L. Oliveira, C. Logullo, Proteolytic activity of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis, Insect Biochem. Mol. Biol. 34 (2004) 443–449.
- [18] E.R. LaVallie, E.A. DiBlasio, S. Kovacic, K.L. Grant, P.F. Schendel, J.M. McCoy, A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm, Biotechnology 11 (1993) 187–193.
- [19] G. Anderluh, I. Gökçe, J. Lakey, Expressing of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner, Protein Expr. Purif. 28 (2003) 173–181.
- [20] D. Sachdev, J.M. Chirgwin, Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to Maltose-binding protein or Thioredoxin, Protein Expr. Purif. 12 (1998) 122–132.
- [21] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [22] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680–685.
- [23] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
- [24] M.H. Sorgine, C. Logullo, R.B. Zingali, G.O. Paiva-Silva, L. Juliano, P.L. Oliveira, A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*, J. Biol. Chem. 275 (2000) 28659–28665.
- [25] A. Seixas, P.C. Dos Santos, F.F. Velloso, I. Da Silva Vaz Jr., A. Masuda, F. Horn, C. Termignoni, A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase, Parasitology 126 (2003) 155–163.
- [26] M. Medina, P. Leon, C.G. Vallejo, *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation, Arch. Biochem. Biophys. 263 (1988) 355–363.
- [27] F. Fagotto, Yolk degradation in tick eggs: 1. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres, Arch. Insect Biochem. Physiol. 14 (1990) 217–235.
- [28] X.D. Liu, J.H. Nordin, Localization of the proenzyme form of the vitellin processing protease in *Blattella germanica* by affinity-purified antibodies, Arch. Insect Biochem. Physiol. 38 (1998) 109–118.
- [29] I. Da Silva Vaz Jr., R.H.M. Martinez, A.T.D. Oliveira, A. Heck, C. Logullo, J.C. Gonzales, H. Dewes, A. Masuda, Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph, Vet. Parasitol. 62 (1996) 155–160.
- [30] P. Willadsen, D. Smith, G. Cobon, R.V. McKenna, Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91, Parasite Immunol. 18 (1996) 241–246.
- [31] H. Hwang, H. Chung, Preparation of active recombinant cathepsin K expressed in bacteria as inclusion body, Protein Expr. Purif. 25 (2002) 541–546.
- [32] T. Kiefhaber, P. Rudolph, H.H. Kohler, J. Buchner, Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation, Biotechnology 9 (1991) 825–829.
- [33] C.H. Schein, M.H.M. Noteborn, Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies, Eur. J. Biochem. 229 (1988) 533–539.
- [34] V. Sardana, B. Xu, J. Zugay-Murphy, Z. Chen, M. Sardana, P.L. Darke, S. Munshi, L. Kuo, A general procedure for the purification of human B-secretase expressed in *Escherichia coli*, Protein Expr. Purif. 34 (2004) 190–196.
- [35] X.A. Yang, X.Y. Dong, Y. Li, Y.D. Wang, W.F. Chen, Purification and refolding of a novel cancer/testis antigen BJ-HCC-2 expressed in the inclusion bodies of *Escherichia coli*, Protein Expr. Purif. 33 (2004) 332–338.
- [36] L.H. Nguyen, R.R. Burgess, Overproduction and purification of sS, the *Escherichia coli* stationary phase specific sigma transcription factor, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 17–22.
- [37] B. Wang, Y. Xu, C. Wu, Y. Xu, H. Wang, Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis*, Protein Expr. Purif. 39 (2005) 184–188.

Appendix A. Supplementary data

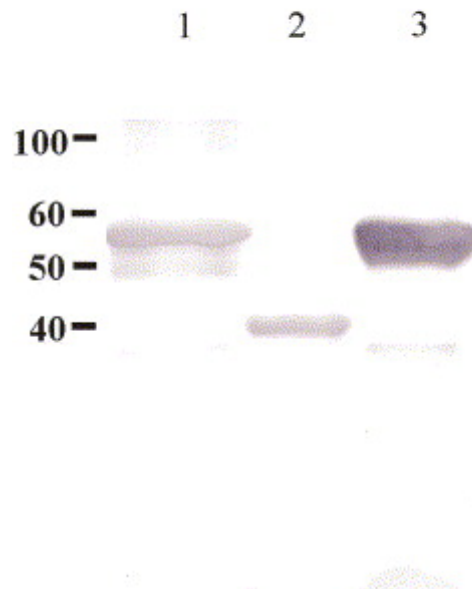


Fig. 8. Western blot of purified BYC and rBYC probed with bovine serum anti-rBYC. Lane 1, rBYC-Trx; lane 2, rBYC; lane 3, native BYC. Alkaline phosphatase-conjugated anti-bovine IgG (1:15000). MW marker $\times 10^3$.

CAPÍTULO II

Artigo submetido à revista *Veterinary Immunology and Immunopathology*.

Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin

Alexandre T. Leal, Adriana Seixas, Paula C. Pohl, Carlos Alexandre S. Ferreira, Carlos Logullo, Pedro L. Oliveira, Sandra E. Farias, Carlos Termignoni, Itabajara da Silva Vaz Jr, Aoi Masuda.

Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin

Alexandre T. Leal ^{a,#}, Adriana Seixas ^{a,#}, Paula C. Pohl ^a, Carlos A.S. Ferreira ^b, Carlos Logullo ^c, Pedro L. Oliveira ^d, Sandra E. Farias ^{a,e}, Carlos Termignoni ^{a,f}, Itabajara da Silva Vaz Jr ^{a,g}, Aoi Masuda ^{a,h,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre – RS 91501-970, Brazil

^b Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

^c Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes – RJ, Brazil

^d Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, Brazil

^e Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

^f Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

^g Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

^h Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel.: +55 (51) 3316-6076, Fax: +55 (51) 3316-7309. *Email address:* aoi@cbiot.ufrgs.br (A. Masuda).

Abstract

Boophilus Yolk pro-Cathepsin (BYC) is an aspartic proteinase found in *Boophilus microplus* eggs that is involved in the embryogenesis and has been tested as an antigen for an anti-tick vaccine. The vaccine potential of a recombinant BYC expressed in *Escherichia coli* (rBYC) was investigated. rBYC was purified and used to immunize Hereford cattle. The sera of bovines immunized with rBYC recognized the native BYC with a titer ranging from 500 to 4,000. Furthermore, immunized bovines challenged with 20,000 larvae presented an overall protection of 25.24%. Bovines with higher antibody titers showed a higher level of protection against *B. microplus*, demonstrating a correlation between antibody titers and protection. The cytokine profile (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ) was verified by RT-PCR, however it did not allow the identification of Th1 or Th2 polarized response associated with rBYC immunization. The partial protection obtained against *B. microplus* infestation with the recombinant protein immunization was similar to the already described for native BYC immunization.

Keywords: *Boophilus microplus*; tick vaccine; BYC, aspartic proteinase, cytokine, bovine.

1. Introduction

The *Boophilus microplus* ixodidae tick causes considerable economical losses to cattle breeding in South and Central Americas, Asia, Africa and Oceania [1]. These damages occur both directly, due to the blood-sucking deleterious effects, which cause losses in animal production, and indirectly by increasing pest control costs. Furthermore, *B. microplus* is a vector of diseases such as anaplasmosis and babesiosis. Conventional tick control methods have been based mainly on the use of acaricides, in spite of the high costs and the rapid appearance of resistance in the tick population [2]. The presence of chemical residues in meat and milk emphasizes the need for novel control methods [3]. Therefore, efforts are being made to develop new methodologies to monitor the emergence of acaricide resistance [4] as well as to promote alternative approaches to tick control such as vaccine [5-10] and biological control [11-13]. An anti-tick vaccine is considered one of the most promising methods; however, its development still depends on the identification and characterization of one or more protective tick antigens [14,15]. Furthermore, the success of this strategy depends on the identification and cloning of key tick molecules, along with the characterization of the roles these molecules play in the arthropod physiology [15,16].

The *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin (BYC) is an aspartic proteinase present in *B. microplus* eggs [17]. The native 54-kDa BYC is activated *in vitro* by auto-proteolysis when incubated in acidic pH, and converted to a 47-kDa polypeptide detected *in vivo* during embryogenesis [17]. Recently, the role of BYC has been demonstrated in the degradation of vitellin (VT), the major yolk protein, thus confirming its importance in embryogenesis [18]. Cattle immunized with native BYC showed a partially protective immune response against tick infestation that was mostly due to an increase in the number of sterile eggs [8]. These data support BYC as a candidate antigen to compose an anti-tick vaccine.

Our preliminary studies with a recombinant BYC expressed in *Escherichia coli* (rBYC) demonstrated its antigenicity and immunogenicity in bovines [19]. In the present study, we described the immunization of bovines with rBYC and the protection obtained against *B. microplus* larvae infestation, the anti-rBYC antibody production, and the peripheral mononuclear cell (PBMC) cytokines profile of immunized bovines and controls.

2. Materials and methods

2.1 Production of recombinant BYC

The recombinant BYC was expressed and purified as previously described [19]. Briefly, BYC cDNA was subcloned into pET-19b expression vectors (Novagen). The recombinant plasmid (pET-19b/BYC) was transformed into *E. coli* strain AD494DE P LysS (Novagen). Induction of expression was done by the addition of 0.4 mM isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) and incubation of the culture at 30 °C for 17 h. Expressed insoluble rBYC was solubilized with 6 M guanidine hydrochloride (GuHCl) and affinity-purified on nickel-charged Sepharose column under denaturing conditions following the manufacturer's instructions. The eluted samples were then dialyzed against 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl (pH 7.4), resulting in the precipitation of purified rBYC. Protein concentration was determined [20] and the rBYC preparation was stored in aliquots at -20 °C.

2.2 Bovine immunization and challenge infestation

Eight 14-month-old Hereford breed females (*Bos taurus*), from a tick-free area, were used. The bovines were individually housed in tick-proof pens on slatted floors and fed twice a day with hay and concentrate, with water available *ad libidum*. The animals were separated into two groups: control group (bovines 1, 2, 3, 4) and treatment group (bovines 5, 6, 7, 8).

The animals received five subcutaneous inoculations in the neck, at 10-day intervals. The control group received emulsion composed of 1 ml PBS plus 1ml of oil adjuvant (Montanide 888 and Marcol 52) per dose. The treatment group animals received emulsion of 1 ml rBYC (1st/2nd dose= 50 µg; 3rd dose= 100 µg; 4th/5th dose= 200 µg) plus 1 ml adjuvant. Ten days after the last inoculation, the bovines were challenged with 20,000 10-day-old Porto Alegre strain larvae of *B. microplus*, *Babesia* spp and *Anaplasma* spp free.

2.3 Serological analysis

Sera samples were collected at various intervals during the immunization and infestation period. The humoral response was verified by Western blot using native BYC as antigen, purified as previously described [17]. The native protein was separated by 12% SDS-PAGE [21] and transferred onto a nitrocellulose membrane (0.45 µm) at 70 V for 1 h at 4 °C in 12 mM carbonate buffer, pH 9.9 [22]. The nitrocellulose sheets were blocked with blotto and probed with sera of vaccinated and control bovines diluted in blotto. For Western blot titration, test sera were diluted from 1:125 up to 1:4,000 and incubated for 2 h at room temperature. After 3 washes with blotto, anti-bovine IgG alkaline phosphatase conjugates diluted 1:10,000 were used as secondary antibodies. Development was performed with NBT/BCIP as previously described [23].

2.4 Cytokine analysis

Messenger RNA (mRNA) transcripts of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10 and interferon gamma (IFN-γ) were assayed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), using qualitative visualization to detect cytokine expression. Blood samples with anticoagulant (sodium citrate) were collected from the jugular vein 24 h after the 5th

immunization. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared by flotation of venous blood diluted in PBS (v:v). Cells were washed in PBS and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 mM 2-mercaptoethanol, 200 UI of penicillin/ml and 150 µg of streptomycin/ml. The PBMC were separated in aliquots with density of 5×10^6 cells/vial and immediately frozen for later *ex vivo* cytokine mRNA analysis [24]. For RNA extraction, the PBMC aliquots were thawed out and pelleted by centrifugation at $300 \times g$ for 6 min and washed once in PBS. Cell pellets were lysed with 1 ml of Trizol reagent (Invitrogen), and total RNA was extracted as described by the manufacturer. First-strand cDNA was synthesized from 6 µl of total RNA in 20 µl reaction in the presence of oligo dT and reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. Cytokine expression was detected by PCR amplification of cDNA using a panel of oligonucleotide primers (Table 1) [25,26], and the gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) was used as positive control for RT-PCR analysis. For negative controls, reactions were prepared without cDNA. For each cytokine, amplification reaction was performed using 2 µl of the RT reaction, 10 pmol of each primer and 10 U of *Taq* DNA polymerase in a final volume of 50 µl. The PCR mix was amplified for 35 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 48°C and 2 min at 72°C, and a final extension of 5 min at 72°C. The RT-PCR products of each RNA sample were visualized by electrophoresis in agarose gels (2%) stained with ethidium bromide.

Table 1: Oligonucleotide primers employed in analysis of bovine cytokines by RT-PCR.

Cytokine	Primer sequences		Size (bp)	Genbank access number	Reference
	Forward	Reverse			
IL 2	ACCTCAAGCTCTCCAGGATG	AGTCATTGTTGAGTAGATGCTTT	307	NM 180997	25
IL 4	ACATCCTCACAACGAGAAAG	GTCTTGGCTTCATTCACAGA	220	NM 173921	25
IL 10	TGTCTGACAGCAGCTGTATCC	CACTCATGGCTTTGTAGACAC	405	NM 174088	25
IFN- γ	CCAAAATCTAACCTCAGAAAGC	CAGAAAAAAAAAGGGTCAAGTG	280	NM 174086	25
HPRT	GGAGATGATCTCTCAACTTAACTGG	CATTATAGTCAAGGGCATATCCCAC	230	BC 103248	26

2.5 Analysis of the ticks

From the 17-post-challenge day until the end of the infestation period, ticks that detached spontaneously were collected once a day. Then the ticks were classified as fully or partially engorged, hemorrhagic, lymphatic and damaged; counted and weighed. Every day, up to 5g of fully engorged ticks were separated and maintained at 28 °C and 85% relative humidity for 20 days, when the eggs were collected, classified as fertile or infertile, weighed and incubated again until hatching to ascertain their viability. The protection was calculated by variation in biological parameters such as: number of fully engorged tick, egg laying capacity and egg fertility. The individual and overall protections were calculated by the interaction of these parameters with the formula [6-9]:

Overall protection ratio = $100 \times [1 (NFE \times WE \times WL)]$; where:

NFE – number of fully engorged ticks from vaccinated bovines/control bovines. WE – egg laying capacity of ticks from vaccinated bovines/control bovines. WL – egg fertility of ticks from vaccinated bovines/control bovines.

Individual protection ratio was calculated with similar formula, but using individual data from vaccinated animal compared with media of control bovines.

IPR= $100 \times [1 (iNFE \times iWE \times iWL)]$; where:

NFE – number of fully engorged ticks from individual vaccinated bovine/mean of control bovines. WE – egg laying capacity of ticks from individual vaccinated bovine/mean of control bovines. WL – egg fertility of ticks from individual vaccinated bovine/mean of control bovines.

3. Results

Serological analyses by Western blot was performed using native BYC as antigen in order to verify the presence of antibodies induced by immunization with the

recombinant protein. Sera samples from bovines vaccinated with rBYC recognized the native BYC in Western blot and the recognition increased gradually along the immunization boosters. The pre-immune sera showed no reaction with BYC and the control group animals showed the same absorbance after the 5th immunization (data not showed). For titration, sera samples collected in the challenge day were diluted (1:125 – 1:4,000) and tested in Western blot against native BYC. Two animals (6 and 7) presented IgG titers of 4,000, whereas bovines 5 and 8 presented lower antibody titers, of 1,000 and 500 respectively (Figure 1).

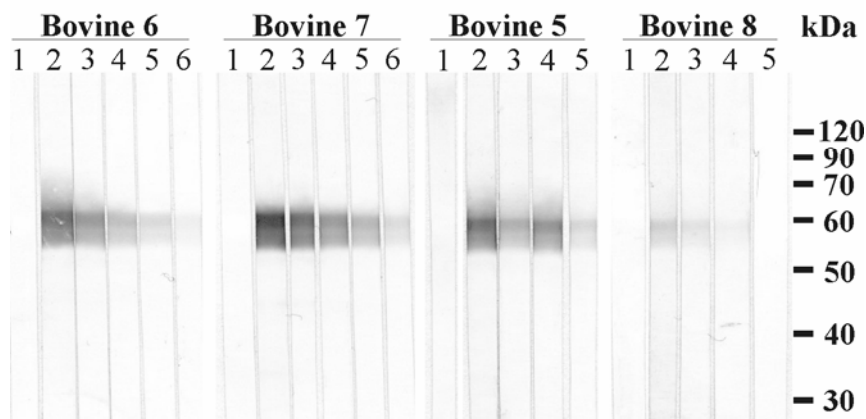


Figure 1: IgG titration by Western blot with native BYC (SDS-PAGE, 12% gel performed under reducing conditions). Sera from immunized bovines collected after 5th dose. Bov 6 – lane 1, pre-immune serum (1:200); lane 2-6, immune serum (1:250, 500, 1000, 2000, 4000). Bov 7 – lane 1, pre-immune serum (1:200); lane 2-6, immune serum (1:250, 500, 1000, 2000, 4000). Bov 5 – lane 1, pre-immune serum (1:200); lane 2-5, immune serum (1:125, 250, 500, 1000). Bov 8 – lane 1, pre-immune serum (1:200); lane 2-5, immune serum (1:125, 250, 500, 1000). MW marker $\times 10^3$.

The cytokine profiles were analyzed by RT-PCR only qualitatively. Freshly isolated PBMC from bovines immunized with rBYC and controls showed expression of

IFN- γ as well as the HPRT positive control. IL 10 expression was detected in 3 animals of the immunized group and 3 animals of the control group, while IL 2 was detected only in bovines 2 and 6 (data not shown). Expression of IL 4 was not detected in this study.

Ticks that naturally detached during the period between the 17th and the 30th day post-infestation were collected daily and the biological parameters were analyzed. The means of the results for each parameter and the differences between groups are presented in table 2. The fully engorged females without macroscopic lesions were counted and weighed and up to 5 g per day were incubated to assess egg laying capacity and fertility. Bovines vaccinated with rBYC showed a reduction of 18.02% and 20.21% in number and weight of engorged ticks, respectively. The egg laying capacity and egg fertility presented, respectively 1.8% and 5.96% reductions in vaccinated animals (Table 2). In this experiment, the overall efficacy ratio against *B. microplus* was 25.24%. Comparing antibody titers and protection rates, the highest titer group (bovines 6 and 7) showed a protection rate of 40.53% (Table 3), while the lowest titer group (bovines 5 and 8) showed a protection rate of 8.24%. A positive correlation was observed between individual protection and antibody titer ($r = 0.72$).

4. Discussion

Different proteins have been identified in *B. microplus* eggs; our research group has characterized two aspartic proteinases, named BYC [17] and THAP [27], and one cysteine proteinase (VTDCE) [28]. Among these, BYC is the most abundant and is the precursor of an aspartic proteinase synthesized in the fat body and gut of the tick, secreted in the hemolymph and stored in oocytes [17]. This protease is activated by autoprolysis under acidic conditions, a process that has been described in other invertebrates in which the

involvement of different classes of acid proteases is observed in the digestion of egg yolk [29-31]. Recently, an *in vitro* investigation demonstrated that BYC is highly specific for vitellin [18], reinforcing the hypothesis that BYC plays a key role in yolk protein degradation, an essential process for embryogenesis [17,18]. Since the native BYC is a phospholipoglycoprotein [17] and rBYC is not glycosylated or phosphorylated, the immunogenicity of the recombinant protein could have been affected. Our preliminary studies demonstrated the antigenicity of rBYC, which was recognized by rabbit, mouse and bovine anti-BYC sera in Western blot [19]. An 80-kDa glycoprotein (GP80) purified from *B. microplus* eggs was protective on vaccination test; however a recombinant form expressed in *E. coli* (rGP80) was not immunogenic and protective [32]. This indicates the importance of the recombinant proteins validation for vaccine applications. In the present study, the recognition of native BYC by sera from rBYC-immunized cattle confirms that the recombinant protein displays epitopes present in native BYC. This characteristic is of paramount importance for a potential vaccine based on recombinant proteins. Based on this assumption, all Western blot experiments in this work were performed with native BYC, in order to detect specific antibodies after rBYC immunization.

The production of recombinant proteins in heterologous systems is a key process in the development of anti-parasite vaccines. High expression of foreign proteins in bacteria often results in aggregation and accumulation [33], and the aspartic proteinases produced in *E. coli* are generally expressed in inclusion bodies (IBs) [34]. In order to obtain rBYC in soluble form, BYC cDNA was cloned into two vectors, but rBYC accumulated in IBs independently of the vectors and expression conditions tested [19]. Other authors have suggested that a particulate recombinant protein can increase the immunogenicity of the recombinant protein [6], which is often less immunogenic when compared to traditional

vaccines [35,36]. In preliminary trials, we used the partially purified IBs for immunization of mouse and bovines, but the bacterial antigens present in IBs were immunodominant and anti-rBYC antibodies presented low titers (data not shown). For this study, the IBs were solubilized with denaturant agent and then rBYC was purified by affinity chromatography. After purification, the denaturant agent was removed by dialysis and rBYC aggregated and precipitated [19].

Table 2: Biological parameters of detached *B. microplus* from cattle immunized with rBYC and control group.

Group	Bovine	Fully engorged ^b		Index	
		Number	Weight (g)	Egg laying capacity ^c	Egg fertility ^d
Control	1	2,419	701	0.416	0.325
	2	1,915	494	0.399	0.320
	3	1,198	309	0.433	0.286
	4	3,245	916	0.402	0.309
	Total	8,777	2420	1.651	1.240
	Mean	2,194	605	0.413	0.310
	SD	861	262	0.015	0.017
	5	2,099	583	0.432	0.339
rBYC	6	1,129	267	0.398	0.310
	7	1,891	498	0.396	0.257
	8	2,076	583	0.395	0.260
	Total	7,195	1931	1.621	1.166
	Mean	1,799	483	0.405	0.292
	SD	456	149	0.018	0.040
	Difference (%)^a	18.02	20.21	1.80	5.96

^a Difference (%) = 100 x (1 – mean value of vaccinated group/control group).

^b Collected during 14 days in the course of the infestation period.

^c The weight of eggs laid by samples of fully engorged ticks, collected daily during 14 days in the course of the infestation period, was used to calculate the proportion of the weight of ticks that was converted into eggs.

^d Proportion between weight of fertile eggs and weight of eggs laid.

Table 3: Biological parameters of detached *B. microplus* from control and immunized groups that presented higher antibodies titer.

Group	Bovine	Fully engorged ^b		Index	
		Number	Weight (g)	Egg laying capacity ^c	Egg fertility ^d
Control	1	2,419	701	0.416	0.325
	2	1,915	494	0.399	0.320
	3	1,198	309	0.433	0.286
	4	3,245	916	0.402	0.309
	Total	8,777	2420	1.651	1.240
	Mean	2,194	605	0.413	0.310
	SD	861	262	0.015	0.017
rBYC	6	1,129	267	0.398	0.310
	7	1,891	498	0.396	0.257
	Total	3,020	765.1	0.794	0.567
	Mean	1,510	382.55	0.397	0.283
	SD	538.81	163.14	0.002	0.038
Difference (%) ^a		31.18	36.76	3.80	5.59

^a Difference (%) = $100 \times (1 - \text{mean value of vaccinated group/control group})$.

^b Collected during 14 days in the course of infestation period.

^c The weight of eggs laid by samples of fully engorged ticks, collected daily during 14 days in the course of the infestation period, was used to calculate the proportion of the weight of ticks that was converted into eggs.

^d Proportion between weight of fertile eggs and weight of eggs laid.

Western blot analyses reveal that rBYC elicited specific anti-BYC IgG in vaccinated bovines, while sera from control animals remained negative during the experimental period. When titrated by Western blot, two bovines presented higher titers (4,000) and two other animals presented titers of 500 and 1,000. Individual variation in antibody titers is frequently observed in vaccination of non-isogenic animals; an

immunization of 98 bovines with Bm86 produced variable antibody titers and 6% of the animals failed to respond to the vaccination [37]. Despite the inherent differences between the titration techniques adopted (Western blot and ELISA), the titers obtained in this work are similar to those of bovines vaccinated with native BYC, which presented titers between 1,600 and 6,400 [8], and of bovines immunized with synthetic peptides derived from the Bm86 glycoprotein, which presented titers between 400 and 2,400 [10]. In previous reports, we demonstrated that cattle vaccination with native BYC induces a humoral response, and that functional anti-BYC antibodies could be observed in the hemolymph of ticks fed on vaccinated cattle [8, 38], resulting in an overall protection between 14% and 36% of bovines challenged with *B. microplus* larvae [8].

In this study, the cattle immunized with rBYC presented reduced tick biological parameters, with an overall protection of 25.24% as compared with control group. The number of fully engorged ticks was the main parameter affected by immunization. Interestingly, bovine antibody titers against BYC could be correlated with tick biological parameters. As observed in table 3, considering only bovines 6 and 7, which showed higher titers (4,000), the overall protection increased to 40%. This has been previously observed in immunization experiments using Bm86, which also showed the correlation between antibody titers and protection [7,37]. Our previous studies with native BYC showed that tick feeding on immunized bovines have active bovine antibodies in tick hemolymph [38] and that fully engorged ticks were affected by inoculation of a monoclonal anti-BYC antibody, with the decrease on survival rate and eggs weight being dependent on the quantity of monoclonal inoculated [38]. Recently, Kashino *et al.* [39] studied the immunoglobulin pattern in bovines with variable levels of resistance to tick.

The research found levels anti-saliva IgG antibodies that were higher in resistant than in susceptible cattle, suggesting a correlation between tick resistance and IgG levels [39].

In the present work, a strongly positive correlation was observed between antibody titer and overall protection of each vaccinated animal, along with strong negative correlations between antibody titer and the number and weight of fully engorged females. This finding indicates that an important decrease occurred in the biological parameters of the ticks that fed on immunized bovines with higher antibody titers. Willadsen *et al.* [40] described an inverse correlation ($r = 0.62$) between the weight of eggs laid and anti-Bm86 antibody titers. Therefore, there is considerable experimental evidence that the natural or vaccination-induced immunities are antibody-mediated [39,40]. Apart from this, our results suggest that BYC protection is dependent on IgG titers, and that the protection level could be improved by modifications in the immunization protocol to increase serum titers. Analyses of different adjuvants and/or immunization protocols as well as the understanding of how immune responses are regulated in ruminants are equally critical aspects in the devising of strategies to direct an immune response toward a desired effector function [41]. Therefore, a systematical study becomes necessary to investigate the immune response involved in vaccination against *B. microplus*.

The analysis of the cytokine expression patterns induced by rBYC-immunization detected the expression of IFN- γ in PBMC of all bovines at a level similar to that of the HPRT gene, while IL-10 expression was detected only in three animals of each group. IFN- γ is typically a Th1-type cytokine, and IL-10 is expressed by all subtypes of Th cells (Th0, Th1 and Th2) of bovines, whereas in mice it is a typical cytokine of Th2 cells [41,42]. Interleukin 4 was not detected in the animals and represents a classical Th2 cytokine [41,42]. Thus, the results observed here were not conclusive with regard to

polarization of the cytokine response in rBYC-immunized bovines. Proliferation assays with cattle PBMC have indicated that the cytokine profile is subject to variation depending upon the precise experimental protocol that is used [42]. Moreover, the Th1/Th2 paradigm, well defined for murine Th cell clones, is an oversimplification of a complex immunoregulatory mechanism that is rather more ambiguous in cattle than in mice [41,42,43].

In this work, we verified that rBYC possesses similar immunological and protective properties as compared to the native protein. Therefore, heterologous expression of recombinant protein in prokaryote systems could provide a valuable source of BYC, which is a potential candidate antigen for multi-component vaccines against *B. microplus* [9]. Other authors have provided evidence that anti-tick immunity induced by a cocktail vaccine is more effective as compared to a single antigen vaccine [5, 7]. Based on these data we can suggest that BYC is a potential antigen to become part of a cocktail vaccine against *B. microplus*.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, FINEP, PRONEX and FAPERGS.

References

- [1] Johnston LAY, Kemp DH, Pearson RD. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. Int J Parasitol 1986; 16: 27-34.
- [2] Nolan J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. Vet Parasitol 1985; 18: 155-166.
- [3] Kunz SE, Kemp DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev Sci Tech 1994; 13: 1249-1286.

- [4] Baxter GD, Barker SC. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and organophosphate-resistant cattle ticks. *Insect Biochem Mol Biol* 2002; 32: 815-820.
- [5] Riding GA, Jarmey J, Makenna RV, Pearson R, Cobon GS, Willadsen P. A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *J Immunol* 1994; 153: 5158-5166.
- [6] Rodriguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Fálcon V, et al. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol* 1994; 33: 135-146.
- [7] Willadsen P, Smith D, Cobon G, Mckenna RV. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol* 1996; 18: 241-246.
- [8] Da Silva Vaz I, Logullo C, Sorgine M, Velloso FF, Rosa de Lima MF, Gonzales JC, et al. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66: 331-341.
- [9] Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Sampaio CA, Tanaka AS. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Internat Immunopharm* 2002; 2: 557-563.
- [10] Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88 (2002) 163-72.
- [11] Kaaya GP, Hassan S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp Appl Acarol* 2000; 24: 913-926.
- [12] Frazzon AP, Da Silva Vaz I, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 2000; 94: 117-125.
- [13] Gindin G, Samish M, Zangi G, Mishoutchenko A, Glazer I. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Exp Appl Acarol* 2002; 28: 283-288.

- [14] Opdebeeck JP. Vaccines against blood-sucking arthropods. *Vet Parasitol* 1994; 54: 205-222.
- [15] Imamura S, Da Silva Vaz I, Sugino M, Ohashi K, Onuma M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as na anti-tick vaccine. *Vaccine* 2005; 23: 1301-1311.
- [16] Willadsen P. Perspectives for subunit vaccines for the control of ticks. *Parassitologia*. 1990; 32: 195-200.
- [17] Logullo C, Da Silva Vaz I, Sorgine M, Paiva-Silva GO, Faria FS, Zingali R, et al. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology* 1998; 116: 525-532.
- [18] Abreu LA, Valle D, Manso PPA, Façanha AR, Pelajo-Machado M, Masuda H, et al. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 2004; 34: 443-449.
- [19] Leal AT, Pohl PC, Ferreira CAS, Nascimento-Silva MCL, Sorgine M, Logullo C, et al. Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 2006; 45: 107-114.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.
- [21] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
- [22] Dunn SD. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western-blot by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* 1986; 157: 144-153.
- [23] Rosa de Lima MF, Ferreira CAS, Freitas DRJ, Valenzuela JG, Masuda A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Ins Bioch Mol Biol* 2002; 32: 747-54.
- [24] Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 103(1-2): 67-75.

- [25] Mwangi DM, Mahan SM, Nyanjui JK, Taracha ELN, McKeever DJ. Immunization of cattle by infection with *Cowdria ruminantium* elicits T lymphocytes that recognize autologous, infected endothelial cells and monocytes. *Infect Immun* 1998; 66: 1855-60.
- [26] Almería S, Canals A, Gómez-Muñoz MT, Zarlenga DS, Gasbarre LC. Characterization of protective immune responses in local lymphoid tissues after drug-attenuated infections with *Ostertagia ostertagi* in calves. *Vet Parasitol* 1998; 80: 53-64.
- [27] Sorgine MH, Logullo C, Zingali RB, Paiva-Silva GO, Juliano L, Oliveira PL. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* 2000; 275: 28659-65.
- [28] Seixas A, Dos Santos PC, Velloso FF, Da Silva Vaz I, Masuda A, Horn F, et al. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology* 2003; 126: 155-163.
- [29] Medina M, Leon P, Vallejo CG. Drosophila cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. *Arch Biochem Biophys* 1988; 263: 355-363.
- [30] Fagotto F. Yolk degradation in tick eggs: 1. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch Insect Biochem Physiol* 1990; 14: 217-235.
- [31] Liu XD, Nordin JH. Localization of the proenzyme form of the vitellin processing protease in *Blattella germanica* by affinity-purified antibodies. *Arch Insect Biochem Physiol* 1998; 38: 109-118.
- [32] Tellam RL, Kemp D, Riding G, Briscoe S, Smith D, Sharp P, Irving D, Willadsen P. 2002. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology* 103: 141-56.
- [33] Hwang H, Chung H. Preparation of active recombinant cathepsin K expressed in bacteria as inclusion body. *Protein Expr Purif* 2002; 25: 541-546.
- [34] Sachdev D, Chirgwin JM. Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to Maltose-binding protein or Thioredoxin. *Protein Expr Purif* 1998; 12: 122-132.
- [35] Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International J Parasitol* 2003; 33: 469-478.

- [36] Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 2001; 19: 2666–2672.
- [37] Rodriguez M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Lorenzo Luaces L, Rubiera R et al. Control of *Boophilus microplus* population in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol* 1995; 57: 339-349.
- [38] Da Silva Vaz I, Martinez RHM, Oliveira ATD, Heck A, Logullo C, Gonzales JC, et al. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet Parasitol* 1996; 62: 155-160.
- [39] Kashino SS, Resende J, Sacco AMS, Rocha C, Proença L, Carvalho WA et al. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp Parasitol* 2005; 110: 12–21.
- [40] Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 1995; 110: S43-S50.
- [41] Brown WC, Rice-Ficht AC, Mark Estes D. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 63: 45–55.
- [42] Johnson DR, Sales J, Matthews JB. Local cytokine responses in *Dictyocaulus viviparus* infection *Vet Parasitol* 2005; 128: 309–318.
- [43] Waldvogel AS, Hediger-Weithaler BM, Eicher R, Zakher A, Zarlenga DS, Gasbarre LC, et al. Interferon- γ and Interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhea virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 77: 201-212.

3. DISCUSSÃO

O significativo prejuízo econômico causado pelo *B. microplus* e as limitações do controle químico tornam necessário a busca de novos métodos para o controle desse carrapato. Essa necessidade é consenso entre produtores, técnicos e pesquisadores de todas as regiões afetadas, sendo o controle imunológico uma das alternativas estudadas. Na busca de concretização desse método várias moléculas tem sido estudadas e, apesar de existir um antígeno comercialmente em uso (Bm86), a identificação e caracterização de antígenos protetores representa o maior desafio para o desenvolvimento de uma vacina totalmente viável (OPDEBEECK, 1994; WILLADSEN, 2004). Esse desafio não se restringe ao *B. microplus*, vale para outros carrapatos e todos os demais parasitas de importância humana e veterinária, sendo ponto de partida para o incipiente desenvolvimento do controle imunológico das parasitoses. Comparado a vacinas bacterianas e virais, o estudo de vacinas contra doenças parasitárias é bem mais recente, em parte pela complexidade dos parasitas e suas relações com o hospedeiro, tornando o desenvolvimento de vacinas parasitárias um trabalho bem mais complicado. A biologia molecular tem permitido grandes avanços nesta área, possibilitando o conhecimento dos organismos e seus mecanismos de interação com o hospedeiro, assim como os mecanismos imunológicos do hospedeiro envolvidos na infestação parasitária. Esses conhecimentos podem permitir a identificação de possíveis moléculas alvo e de como a resposta do hospedeiro pode ser alterada/direcionada para uma resposta efetiva contra o parasita (REED & CAMPOS-NETO, 2003; WILLADSEN, 2004). Além disso, a clonagem e expressão heteróloga de genes é uma ferramenta fundamental para viabilizar a

produção de antígenos vacinais, evitando as dificuldades inerentes à utilização de antígenos brutos (extratos).

Nesse contexto, esse trabalho buscou produzir um antígeno de *B. microplus* (BYC) em sistema heterólogo e testar seu potencial vacinal, visando verificar a capacidade imunogênica e protetora da proteína recombinante, que foi previamente observada com a proteína nativa (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998). A *Boophilus yolk pro-catepsina* (BYC) foi descrita em 1998, sendo identificada a partir de um extrato de ovos de *B. microplus*. Neste trabalho, foi descrito a purificação e caracterização da BYC, sugerindo seu provável envolvimento na embriogênese do *B. microplus* (LOGULLO *et al.*, 1998). A seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal e de seqüências internas apresentou homologia com várias aspártico proteinases, sendo a primeira aspártico envolvida na degradação de proteínas do ovo a ser descrita em carrapatos (LOGULLO *et al.*, 1998). A partir da seqüência de aminoácidos da BYC foram desenhados primers degenerados para a clonagem do cDNA correspondente, usando uma biblioteca de cDNA preparada a partir de corpo gorduroso de teleóginas (NASCIMENTO-SILVA, comunicação pessoal). O cDNA correspondente a BYC foi obtido, porém, com ausência dos nucleotídeos correspondentes aos 6 aminoácidos N-terminais da proteína nativa previamente seqüenciada (LOGULLO *et al.*, 1998).

No presente trabalho, inicialmente o cDNA da BYC foi amplificado por PCR e clonado no vetor de expressão pET-23d, com o seqüenciamento de DNA confirmando a correta inserção do cDNA da BYC no vetor de expressão. Este vetor foi submetido a diferentes condições de expressão e os resultados obtidos

revelaram expressão de BYC recombinante em quantidade muito pequena e somente na forma insolúvel (ANEXO 1). Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho indicaram que o vetor pET-23d-BYC seria inviável para produção e purificação da proteína recombinante em quantidade e qualidade suficiente para os trabalhos de imunização (ANEXO 1). Para contornar essas dificuldades o trabalho foi redirecionado, focando em dois pontos principais; 1- restaurar a região do cDNA correspondentes aos 6 aminoácidos N-terminais da BYC e, 2- utilizar novos vetores de expressão, visando aumentar o nível de expressão e a obtenção da proteína recombinante na forma solúvel; como descrito no artigo I (LEAL *et al.*, 2006).

O cDNA da BYC foi restaurado através de PCR e usado para clonagem nos vetores de expressão. Foram selecionados dois vetores do sistema pET (Novagen), o primeiro (pET-32b) permite a clonagem com a proteína de fusão tioredoxina (Trx) e cauda de histidina (N-terminal) e o segundo (pET-19b) apenas com as características básicas do sistema pET, incluindo o promotor T7, que permite o controle da expressão (STUDIER & MOFFAT, 1986). A escolha da proteína de fusão Trx buscou favorecer a obtenção da BYCr na forma solúvel, já que vários trabalhos relatam a eficiência da proteína tioredoxina (Trx) no aumento da solubilidade de proteínas recombinantes em *E. coli*, seja como proteína de fusão (LA VALLIE *et al.*, 1993; SACHDEV & CHIRGWIN, 1998; ANDERLUH *et al.*, 2003) ou como proteína co-expressada (YUAN *et al.*, 2004).

Os dois vetores avaliados (pET-32b e pET-19b) permitiram a expressão de BYC recombinante em altos níveis, sendo um pouco superior no pET-32b, porém a proteína foi expressa na forma insolúvel, independente do vetor e da proteína

de fusão. Proteínas heterólogas, expressas em *E. coli* em grandes quantidades, freqüentemente acumulam e formam agregados insolúveis, os chamados corpúsculos de inclusão (SAMBROOK *et al.*, 1989). SACHDEV & CHIRGWIN (1998) descreveram que aspártico proteinases expressadas em *E. coli* são geralmente obtidas em CIs, até mesmo na presença de proteínas de fusão como Trx e MBP (Maltose Binding Protein). Em geral, um dos motivos da agregação na expressão heteróloga em *E. coli* é a alta taxa de tradução, que excede a capacidade de processamento da célula; muitas vezes isso pode ser evitado pela indução em temperaturas baixas, que reduz a taxa de síntese de proteína (SCHEIN & NOTEBORN, 1988). Para verificar essa possibilidade realizamos a expressão de BYCr e BYCr-Trx sob temperatura de 18 e 23 °C, porém a redução na temperatura não evitou a formação dos corpúsculos de inclusão (dados não mostrados). Nossos dados sugerem que a BYCr foi expressa na forma insolúvel, possivelmente, devido a problemas de conformação da proteína na célula bacteriana e, a ausência das modificações pós-traducionais podem ter contribuído para essa agregação, apesar da glicosilação não ser essencial para o “folding” correto de outras aspártico proteinases (SACHDEV & CHIRGWIN, 1998; HWANG & CHUNG, 2002).

Vários tipos de agentes solubilizantes e diferentes protocolos tem sido descritos para solubilização e “refolding” de CIs (TSUMOTO *et al.*, 2003; SARDANA, *et al.*, 2004). Uréia, hidrocloreto de guanidina (HClGu) e detergentes como o N-lauroil sarcosina (sarcosina) são alguns dos agentes solubilizantes mais comumente empregados na solubilização de CIs (TSUMOTO *et al.*, 2003) e foram os que avaliamos na solubilização de BYCr-Trx e BYCr. A uréia (8M) apresentou

o mais baixo rendimento de solubilização dos CIs, seguido pelo hidrocloreto de guanidina (6M), que rendeu 65 % e 78 % de BYCr e BYCr-Trx, respectivamente. A ligação destes dois agentes à proteína é dependente da concentração e geralmente exige altas concentrações (6-8M uréia e 6-7M HClGu) do desnaturante para solubilização dos CIs, o que em alguns casos não é suficiente para evitar as interações intra e inter-cadeia responsáveis pela agregação das proteínas (TSUMOTO *et al.*, 2003). As duas formas de BYCr solubilizadas com HClGu foram purificadas em coluna de afinidade por metal sob condições desnaturantes, porém quando o agente desnaturante foi removido as proteínas agregaram novamente, mesmo com a remoção gradual do HClGu. A remoção gradual do agente desnaturante tem sido descrita como medida essencial para evitar a reagregação de proteínas solubilizadas e o uso de co-solventes como glicerol e glutatona reduzida podem auxiliar o processo de “refolding” (HWANG & CHUNG, 2002; SARDANA, *et al.*, 2004). Porém, em alguns casos essas medidas não evitam a reagregação e refolding, YANG *et al.* (2004) observaram a reagregação e precipitação da proteína recombinante BJ-HCC-2 (antígeno tumoral) durante a remoção do HClGu, mesmo na presença de diferentes co-solventes como NP40 e glicerol; indicando a existência de uma considerável variação individual entre diferentes proteínas.

A solubilização com sarcosina foi a que apresentou os melhores resultados, com rendimento superior a 90%, tanto para BYCr como para BYCr-Trx. O N-lauroil sarcosina é um detergente aniônico que interage com os resíduos hidrofóbicos, reduzindo a hidrofobicidade da molécula (YANG *et al.*, 2004). De acordo com TSUMOTO *et al.* (2003), as proteínas solubilizadas com detergentes

apresentam uma estrutura mais ordenada do que aquelas solubilizadas com uréia e guanidina. Ao contrario destes desnaturantes, que são dependentes de concentração, a ligação de um detergente a proteína é dependente do seu CMC (critical micelle concentration), que determina o modo de ligação. Abaixo do CMC ocorre uma ligação estequiométrica (mono-molecular), onde as proteínas são pouco solúveis; enquanto acima do CMC a ligação é do tipo micelar, onde as proteínas são altamente solúveis (TSUMOTO *et al.*, 2003). Por outro lado, o CMC também é determinante na remoção do detergente, sendo facilmente removido por diálise quando está abaixo do CMC (NGUYEN & BURGESS, 1996). Neste trabalho, usamos sarcosina a 0,3 %, que corresponde a 10,2 mM, portanto, abaixo do CMC deste detergente, que é de 14,5 mM. Dessa forma, obtivemos um alto índice de solubilização dos CIs abaixo do CMC do sarcosina, permitindo sua remoção através da diálise. Nossos resultados demonstraram que a proteína de fusão Trx e o pH foram decisivos na manutenção da solubilidade durante a remoção do detergente. O rendimento de BYCr-Trx solúvel foi de 84 %, contra 6 % de BYCr, em pH 8,0. SACHDEV & CHIRGWIN (1998) observaram resultados semelhantes com outras aspártico proteinases, que também foram expressas em CIs mas tiveram a solubilidade aumentada (após o tratamento desnaturante) pelas proteínas de fusão Trx e MBP, sugerindo que as proteínas de fusão parecem ter bloqueado as ligações laterais responsáveis pela agregação durante o “refolding”. Os resultados desse estudo demonstraram que a proteína de fusão Trx aumentou o rendimento de proteína solúvel, podendo ser aplicado a outras proteínas recombinantes.

A BYC recombinante produzida em *E. coli* não possui a glicosilação e fosforilação características da proteína nativa (LOGULLO *et al.*, 1998). Para averiguar o efeito dessas diferenças na antigenicidade das formas recombinantes, sondamos a BYCr e BYCr-Trx com soro anti-BYC de diferentes espécies, obtido de animais previamente imunizados com a proteína nativa. Os resultados do “Western blot” mostraram que as formas recombinantes foram reconhecidas pelos anticorpos anti-BYC, com intensidade um pouco menor que a BYC, mas confirmando que a BYCr e BYCr-Trx possuem epítomos que foram imunogênicos na imunização com a BYC nativa. Proteínas recombinantes destinadas a utilização como imunógenos devem apresentar no mínimo algum epítopo reconhecido na infecção ou imunização com a proteína nativa, sendo o ponto de partida para investigação de potencial vacinal de um antígeno recombinante (SOLOMON *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2004). Portanto, os resultados confirmando a antigenicidade foram fundamentais para continuidade dos estudos de avaliação da BYC recombinante como antígeno vacinal.

A partir da comprovação da antigenicidade da BYC recombinante, poderíamos dar início a segunda fase experimental, para verificar a capacidade da BYCr induzir resposta imunológica protetora em bovinos. Todavia, cabe salientar dois pontos que foram considerados antes do delineamento experimental para vacinação em bovinos.

Primeiro: Os CIs parcialmente purificados não poderiam ser utilizados para imunização de bovinos? Outros autores sugerem que proteínas particuladas podem aumentar a imunogenicidade de proteínas recombinante (RODRIGUEZ *et*

al., 1994), que geralmente são menos imunogênicas quando comparadas a antígenos tradicionais (SINGH & O'HAGAN, 2003; AUCOUTURIER *et al.*, 2001). A BYCr é a proteína majoritária no corpúsculo de inclusão parcialmente purificado e a estrutura particulada do CI poderia aumentar sua imunogenicidade, sugerindo o uso deste tipo de preparação.

Segundo: Qual a preparação de proteína recombinante deveria ser usada, BYCr-Trx ou BYCr? Se os experimentos de imunização requeressem a utilização de proteína na forma solúvel, a utilização de BYCr-Trx poderia suprir essa necessidade. A proteína de fusão Trx é um pequeno monômero de aproximadamente 11 kDa (LA VALLIE *et al.*, 1993; ANDERLUH *et al.*, 2003), portanto a presença dessa proteína de fusão poderia não interferir na antigenicidade da BYCr. Por outro lado, a proteína de fusão pode ser removida pela clivagem com enteroquinase, porém, o custo deste processo inviabilizaria o projeto, pois um experimento de imunização demanda uma quantidade considerável de proteína (miligramas). Além disso, haveria o risco de agregação da BYCr pela remoção da Trx.

Para elucidar esses questionamentos e orientar o delineamento experimental da fase seguinte, realizamos alguns ensaios de imunização de camundongos e de um bovino, usando BYCr-Trx na forma de CIs parcialmente purificados. Os animais responderam à imunização, mas o título de anticorpos detectados contra BYC nativa foi muito baixo (ANEXO 2). O bovino imunizado com CI (BYCr-Trx) apresentou título de 3.200 contra BYCr-Trx, porém frente a BYC nativa o título foi de apenas 1:200 (ANEXO 2). Esses resultados indicaram

que: 1- os antígenos bacterianos presentes no CI foram imunodominantes, apesar de estarem em menor quantidade no CI; 2- a proteína de fusão Trx foi reconhecida pelo sistema imune e interferiu na resposta, esse resultado foi bastante claro no “Western blot” com soro do bovino, que reagiu fortemente com a BYCr-Trx e fracamente com a BYC nativa (ANEXO 3); 3- o fraco reconhecimento da BYC nativa denota que, mesmo sob interferência de outras moléculas, a BYCr foi reconhecida pelo sistema imunológico e induziu uma fraca resposta anti-BYC. Em resumo, os ensaios revelaram que a utilização de BYCr-Trx na forma de CIs parcialmente purificados interferiram na imunogenicidade da BYC recombinante, sugerindo que a utilização da BYCr (sem Trx) purificada em coluna de afinidade poderia melhorar a imunogenicidade da proteína recombinante. Baseado nisto, foi realizado um novo teste preliminar para imunização de um bovino com BYCr solubilizada com hidrocloreto de guanidina e purificada em coluna de afinidade (Ni^{+2} Sepharose). O resultado desse teste, apresentado como suplemento do artigo I (Figura 8), comprovou a imunogenicidade da BYCr, que induziu a produção de anticorpos capazes de reconhecer epítopos tanto nas formas recombinantes (BYCr e BYCr-Trx) como na BYC nativa. A partir destes resultados, foi dado prosseguimento aos experimentos de vacinação de bovinos, que correspondem à segunda fase do trabalho.

Os bovinos imunizados com BYCr desenvolveram resposta humoral (IgG) contra o antígeno, a qual foi detectada tanto no ELISA como no “Western blot”, enquanto os animais controle não apresentaram anticorpos anti-BYC durante o período experimental. Houve uma considerável variação individual no título de anticorpos, com dois animais apresentando título alto (4.000) e outros dois com

título baixo (1.000 e 500). Variação individual no título de anticorpos é frequentemente observada em vacinação de animais não isogênicos e tem sido descrita em outros experimentos de vacinação (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998; ANDREOTTI *et al.*, 2002). Estudos de imunização com Bm86 (WILLADSEN *et al.*, 1995; WILLADSEN *et al.*, 1996; RODRIGUEZ *et al.*, 1995) também relatam variação individual no título de anticorpos e na intensidade da resposta imunológica dos bovinos, RODRIGUEZ *et al.* (1995) relataram 6 % de animais que não responderam a imunização, de um total de 98 bovinos vacinados com a proteína recombinante.

Os títulos de anticorpos observados neste estudo, por “Western blot”, são similares aqueles observados nos experimentos com BYC nativa, que apresentaram títulos de IgG entre 1.600 e 6.400 no ELISA (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998), apesar da diferença na metodologia. Optamos pela titulação em “Western blot” a fim de evitar o “background” observado no ELISA com soro negativo de alguns bovinos, evitando assim que ligações inespecíficas interferissem na interpretação dos resultados. Estudos anteriores com a BYC nativa demonstraram a capacidade deste antígeno induzir resposta humoral em bovinos e que estes anticorpos são observados na hemolinfa de carrapatos alimentados em animais vacinados (DA SILVA VAZ *et al.*, 1996; DA SILVA VAZ *et al.*, 1998), resultando entre 14 e 36 % de proteção global contra infestação de *B. microplus* (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998). Teleóginas inoculadas com o anticorpo monoclonal BrBm5 (anti-BYC) apresentaram redução na taxa de sobrevivência e no peso de ovos de maneira dependente da quantidade de anticorpo inoculada (DA SILVA VAZ *et al.*, 1996). No presente estudo, obtivemos um índice de proteção global de 25 % e o

número de teleóginas foi o principal parâmetro afetado pela vacinação. Nenhum dos parâmetros individuais analisados (Tabela 2) apresentou diferença estatisticamente significativa entre a média do grupo controle e tratamento. A análise estatística pode ter sido prejudicada pelo pequeno número de animais por grupo (4) e pelas diferenças individuais na resposta imunológica dos bovinos. Apesar de estatisticamente não significativo, acreditamos que as diferenças observadas tem significado biológico no parasitismo, traduzindo-se no índice de proteção global, que considera diferentes parâmetros individuais. Além disso, quando analisamos somente os animais com alto título de anticorpos (bovinos 6 e 7) o índice de proteção global sobe para 40 %, indicando a existência de correlação entre título de anticorpos e proteção vacinal (Tabela 3).

Experimentos de imunização com Bm86 também relataram esse tipo de correlação (WILLADSEN *et al.*, 1995; RODRIGUEZ *et al.*, 1995). Outro estudo recentemente apresentado, avaliou o padrão de imunoglobulinas anti-saliva de *B. microplus* em bovinos com diferentes graus de resistência natural ao carrapato, encontrando maiores níveis de IgG em animais resistentes (KASHINO *et al.*, 2005). Além da correlação entre título de anticorpos e proteção, outros achados experimentais sugerem que os anticorpos são a principal linha de defesa contra os carrapatos. Moléculas de IgG intactas foram observadas na hemolinfa de diferentes carrapatos, como *Ixodes ricinus* (BROSSARD & RAIS, 1984), *Hyalomma excavatum* e *Rhipicephalus sanguineus* (BEM-YAKIR, 1989). A identificação de uma proteína ligante de IgG (immunoglobulin G-Binding Proteins –IGBPs) na saliva de *R. appendiculatus* é outro achado que demonstra a importância dos anticorpos na resposta contra carrapatos (WANG & NUTTALL,

1994). Em *B. microplus* foi identificado um gene similar a IGBP sendo abundantemente expresso na glândula salivar de machos (KASHINO *et al.*, 2005). Estes autores sugerem que a presença de uma IGBP na saliva de *B. microplus* é um forte indicativo de que os anticorpos exercem um efeito deletério sobre o carrapato. Saliva de *I. ricinus* inibe a secreção de IL10 por células B ativadas e a proliferação de células B estimuladas (HANNIER *et al.*, 2003; HANNIER *et al.*, 2004), sendo outro indicativo do envolvimento de anticorpos. Apesar das evidências experimentais, ainda não foi obtida uma prova definitiva de como os anticorpos atuam contra os carrapatos e da sua verdadeira importância no controle da parasitose.

Neste contexto, possíveis alterações no protocolo de imunização com BYCr que resultem em maiores títulos de anticorpos podem aumentar os índices de proteção vacinal. Uma nova geração de vacinas baseadas em antígenos recombinantes, geralmente menos imunogênicos que antígenos tradicionais, tem estimulado a busca de novos adjuvantes, visando potencializar e direcionar a resposta imunológica do hospedeiro (AUCOUTURIER *et al.*, 2001; SINGH & O'HAGAN, 2003). Novos sistemas de entrega, como micropartículas catiônicas (SINGH *et al.*, 2000), ISCOMs (BARR *et al.*, 1998) e lipossomos (ALVING, 1992; GUY *et al.*, 2001; CHAMBERS *et al.*, 2004) são alternativas à tradicional emulsão e podem ser utilizados em associação com moléculas imunoestimulantes (SINGH & O'HAGAN, 2003). Basicamente, os adjuvantes de entrega potencializam o reconhecimento do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) e a ativação de células T (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Outra opção são os adjuvantes imunoestimulantes como LPS, MPL ("Monophosphoryl Lipid A",

derivado de LPS) (ULRICH & MYERS, 1995), dinucleotídeos não metilados – CpG (KRIEG *et al.*, 1995) e as saponinas (SINGH & O'HAGAN, 2003), que são capazes de estimular e direcionar a resposta imunológica para uma via específica, Th1 por exemplo (SINGH & O'HAGAN, 2003; BROWN *et al.*, 1998). Até mesmo citocinas tem sido utilizadas como adjuvantes imunoestimulantes, visando direcionar a resposta para uma função efetora desejada (ABBAS & LICHTMAN, 2003).

O estudo da resposta imunológica em doenças infecciosas e parasitárias visando a caracterização do subtipo de células T dominante tem permitido o melhor entendimento dos mecanismos imunes envolvidos e fornece subsídios para melhorar os resultados com vacinação (BROWN *et al.*, 1998). Em nosso estudo, buscamos verificar o padrão de expressão de citocinas induzidas pela vacinação com BYCr, visando detectar, ou não, a polarização da resposta em tipo Th1 ou Th2. Como previamente descrito por outros autores (CHAMIZO *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2005; CHAMIZO *et al.*, 2001), utilizamos célula mononucleares de sangue periférico (PBMC) dos bovinos imunizados para extração de RNA e avaliação do padrão de citocinas. Nossos resultados detectaram expressão de IFN- γ em PBMC de todos os bovinos, independente do imunógeno, enquanto IL-10 foi detectada em três animais de cada grupo. O IFN- γ é uma citocina tipicamente Th1 e IL-10 é detectada em todos os tipos de células T (Th0, Th1 e Th2) de bovinos, embora seja uma citocina tipicamente Th2 em camundongos (BROWN *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 2005). Interleucina 4 (IL-4), classicamente do tipo Th2 (BROWN *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 2005), não foi detectada em nenhum dos animais deste experimento. Tomados juntos, esses

resultados poderiam sugerir uma resposta tipo Th1 dominante, porém, devemos considerar o seguinte: 1- não foi detectado diferenças entre os grupos controle e tratamento que permitam correlacionar perfil de citocinas com vacinação; 2- patógenos virais e bacterianos podem estar associados com IFN- γ [Th1] (JOHNSON *et al.*, 2005) e os bovinos desse experimento não foram mantidos em condições “germ free”; 3- adjuvantes oleosos induzem resposta Th1 (SINGH & O’HAGAN, 2003; AUCOUTURIER *et al.*, 2001), o que poderia explicar a polarização Th1 inespecífica. Portanto, os resultados observados não são conclusivos a respeito do padrão de citocinas e polarização da resposta em bovinos imunizados com BYCr. Além disso, o paradigma Th1/Th2, bem definido em camundongos, é uma simplificação de um complexo mecanismo imunoregulatório que é muito mais ambíguo em bovinos que em camundongos (BROWN *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 2005; WALDVOGEL *et al.*, 2000). Cultivos *in vitro* de PBMCs estimulados com BYCr poderiam auxiliar na caracterização do tipo de resposta imune desencadeada por este antígeno, porém, teste de proliferação celular com PBMCs bovinos tem indicado que o padrão de citocinas é sensível a variações no protocolo experimental (JOHNSON *et al.*, 2005), dificultando a avaliação dos resultados. Os mecanismos de resposta do sistema imunológico de bovinos frente a carrapatos e a vacinação, apesar de crucial para o desenvolvimento de estratégias capazes de direcionar a resposta para uma função efetora desejável (BROWN *et al.*, 1998), ainda são pouco conhecidos. Novos estudos sistemáticos para investigar a resposta imunológica envolvida no parasitismo e na vacinação contra *B. microplus* são necessários para desenvolver os métodos de controle imunológico deste carrapato.

Neste trabalho verificamos que a BYC recombinante possui características imunogênicas similares a proteína nativa, validando a proteína recombinante para uso vacinal. Isso é particularmente importante para glicoproteínas expressas em *E. coli*. Uma glicoproteína de 80 kDa (GP80), produto da vitelogenina do ovo de *B. microplus*, foi avaliada como imunógeno e comparada a GP80 expressa em *E. coli*, a qual não foi imunogênica e protetora como a proteína nativa (TELLAM *et al.*, 2002). Os autores sugerem que a ausência de glicosilação e/ou erros de conformação da proteína recombinante podem ter sido responsáveis pela falta de imunogenicidade da GP80 recombinante (TELLAM *et al.*, 2002). Em nosso estudo a ausência da porção glicolipídica não parece ter afetado a imunogenicidade da proteína recombinante, assim como em outros estudos envolvendo a Bm86 expressa em *E. coli* (WILLADSEN *et al.*, 1996). Esses resultados indicam que as características imunogênicas variam de acordo com cada proteína recombinante, exigindo confirmação experimental do seu potencial vacinal.

A teoria dos antígenos ocultos direcionou a busca inicial de antígenos alvos e várias proteínas foram identificadas e avaliadas como imunógenos, como Bm86 (WILLADSEN & KEMP, 1988), Bm91 (WILLADSEN *et al.*, 1996), BYC (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998), Bm95 (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2000), vitelina (TELLAM *et al.*, 2002), BmT1s (ANDREOTI *et al.*, 2002), dentre outras. Recentemente tem aumentado o interesse no estudo de proteínas envolvidas na interação parasita-hospedeiro e seu potencial como antígenos alvo (WILLADSEN, 2004; NUTTALL & LABUDA, 2004). A proteína ligante de IgG encontrada na saliva de carrapatos (WANG & NUTTALL, 1999) e proteínas do cemento (MULENGA *et al.*, 1999) são exemplos de proteínas naturalmente expostas ao hospedeiro e que tem sido

propostas como alvo vacinal. TRIMMELL *et al.* (2002) apresentaram um novo conceito: “Dual action vaccine”, ou seja uma vacina baseado em um imunógeno exposto capaz de reconhecer antígenos ocultos. O estudo utilizou uma forma recombinante truncada de uma proteína do cemento de *R. appendiculatus*, a qual foi imunogênica e induziu anticorpos capazes de reconhecer epítomos antigênicos na glândula salivar, intestino e hemolinfa de fêmeas adultas. A alimentação do carrapato no hospedeiro imunizado estimulou a memória imunológica e aumentou o título de anticorpos, indicando que a infestação natural pode atuar como reforço vacinal (TRIMMELL *et al.*, 2002).

Neste contexto de diferentes antígenos, alguns autores têm evidenciado que a imunidade anti-carrapato induzida por associação de imunógenos pode ser mais efetiva que as vacinas baseadas em um antígeno único (WILLADSEN *et al.*, 1996; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2000). Embora, a associação de diferentes antígenos protetores não seja uma verdade absoluta, a maioria dos pesquisadores acredita que o desenvolvimento de uma vacina multiantígeno seja o caminho para controle imunológico de diferentes carrapatos. Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que a BYC recombinante é um antígeno com potencial para compor uma vacina contra o carrapato *B. microplus*.

4. CONCLUSÕES

- As duas formas recombinantes de BYC obtidas no estudo possuem epítomos comuns aos encontrados na proteína nativa;
- Os títulos de anticorpos anti-BYCr apresentaram uma forte correlação com os parâmetros de proteção avaliados neste estudo;
- O índice de proteção conferido pela vacinação com BYCr sugere que a forma recombinante desta proteína poderá compor uma vacina multiantígeno contra o *B. microplus*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K. & LICHTMAN, A.H. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Elsevier Science, 2003.
- ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. *Total de Exportações Brasileiras de Carne Bovina, jan. a dez. de 2005*. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.abiec.com.br/tabela.asp?id_perodo=1. Arquivo capturado em 03 de fevereiro de 2006.
- ABREU, L.A.; VALLE, D.; MANSO, P.P.A.; FAÇANHA, A.R.; PELAJO-MACHADO, M.; MASUDA, H.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I.; LENZI, H.; OLIVEIRA, P.L. & LOGULLO, C. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 443-449, 2004.
- ANDERLUH, G.; GÖKÇE, I. & LAKEY, J. Expressing of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner. *Protein Expression and Purification*, 28: 173-181, 2003.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K.C.; SASAKI, S.D.; SAMPAIO, C.A. & TANAKA, A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*, 2: 557-563, 2002.
- ALVES-BRANCO, F.P.; ECHEVARRIA, F.A.M. & SIQUEIRA, A.S. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. *Comunicado Técnico da EMBRAPA*, 1: 1-4, 1983.
- ALVING, C.R. Immunologic aspects of liposomes: presentation and processing of liposomal protein and phospholipid antigens. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1113: 307-322, 1992.

- AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L. & GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, 19: 2666–2672, 2001.
- BARR, I.G.; SJOLANDER, A. & COX, J.C. ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32: 247–271, 1998.
- BASSO, L.M.S.; MONTEIRO, A.C.; BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; GARCIA, M.V. & MOCHI, D.A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40 (6): 595-600, 2005.
- BASTIANI, M.; HILLEBRAND, S.; HORN, F.; KIST, T.B.; GUIMARÃES, J.A. & TERMIGNONI, C. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1439-1446, 2002.
- BEM-YAKIR, D. Quantitative studies of host immunoglobulins G in the hemolymph of ticks (Acari). *Journal of Medical Entomology*, 24: 243-246, 1989
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G. & FACCINI, J.L.H. Mecanismo de penetração do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus*, em condições experimentais. *Ciência Rural*, 29: 351-354, 1999.
- BRAZ, G.R.C.; COELHO, H.S.L.; MASUDA, H. & OLIVEIRA, P.L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Current Biology*, 9: 703-706, 1999.
- BROSSARD, M. & RAIS, O. Passage of hemolysins through the midgut epithelium of female *Ixodes ricinus* L. fed on rabbits infested or reinfested with tick. *Experientia*, 40: 561-563, 1984.
- BROSSARD, M. & WIKEL, S.K. Tick immunobiology. *Parasitology*, 129: S161–S176, 2004.

- BROWN, W.C.; RICE-FICHT, A.C. & MARK ESTES, D. Bovine type 1 and type 2 responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 63: 45–55, 1998.
- BRUM, J.G.W. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei*: etiopatogenia e sazonalidade. Tese (Doutor em ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio Janeiro, 1988.
- CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, M.W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J. & FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39: 247-253, 2002.
- CHAMBERS, M.A.; WRIGHT, D.C.; BRISKER, J.; WILLIAMS, A.; HATCH, G.; GAVIER-WIDÉN, D.; HALL, G.; MARSH, P.D. & HEWINSON, R.G. A single dose of killed *Mycobacterium bovis* BCG in a novel class of adjuvant (Novasome™) protects guinea pigs from lethal tuberculosis. *Vaccine*, 22: 1063–1071, 2004.
- CHAMIZO, C.; MORENO, J. & ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 103: 67-75, 2005.
- CHAMIZO, C.; RUBIO, J.M.; MORENO, J. & ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells zby a single tube RT-PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 83: 191-202, 2001.
- CNPC, Conselho Nacional da Pecuária de Corte. *Balanço da Pecuária Bovídea de Corte - 1994 a 2005*. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.abiec.com.br/estatísticas/14.pdf>. Arquivo capturado em 03 de fevereiro de 2006.
- COPPOLINO, M. G. & DEDHAR, S. Molecules in focus: calreticulin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30: 553-558, 1998.

- CORDOVÉS, C.O. *Carrapato: controle e erradicação*. Alegrete: Gralha, 1996.
- DA COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.; DE MORAES, A.M. & BITTENCOURT, V.R. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, 154: 207-209, 2002.
- DA SILVA VAZ JR., I.; MARTINEZ, R.H.M.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOGULLO, C.; GONZALES, J.C.; DEWES, H. & MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*, 62: 155-160, 1996.
- DA SILVA VAZ JR., I.; LOGULLO, C. J.; SORGINE, M.; VELLOSO, F.F.; ROSA DE LIMA, M.F.; GONZALES, J.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L. & MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66: 331-341, 1998.
- DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. & SNYDER, D.E. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology*, 99: 41-52, 2001.
- ELDER, J.K.; KEARNAN, J.F.; WATERS, K.S.; DUNWELL, G.H.; EMMERSON, F.R.; KNOTT, S.G. & MORRIS, R.S. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistant cattle and pasture spelling. *Australian Veterinary Journal*, 56: 219-223, 1980.
- FARIAS, N.A.R.; GONZALES, J.C. & SAIBRO J.C. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 21: 1313-1320, 1986.
- FERNANDES, F.F.; FREITAS, E.P.S.; COSTA, A.C. & SILVA, I.G. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 1243-1245, 2005.

- FERREIRA, C.A.; DA SILVA VAZ JR., I.; DA SILVA, S.S.; HAAG, K.L.; VALENZUELA, J.G. & MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology*, 101: 25-34, 2002a.
- FERREIRA, C.A.; BARBOSA, M.C.; SILVEIRA, T.C.; VALENZUELA, J.G.; DA SILVA VAZ JR., I. & MASUDA, A. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*, 125: 265-74, 2002b.
- FRAZZON, A. P.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 94: 117-125, 2000.
- GARCIA-GARCIA, J.C.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS, M.; CANALES, M.; BOUE, O.; RODRÍGUEZ, M.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; GONZÁLEZ, I.L.; VALDÉS, M.; MÉNDEZ, L. & DE LA FUENTE, J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*, 18: 2275-2287, 2000.
- GEORGE, J.E.; POUND, J.M. & DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129: S353–S366, 2004.
- GOBERT, G.N. The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. *Parasitology Today*, 14: 115-118, 1998.
- GOMES, A. Carrapato-de-boi: Prejuízos e controle. *EMBRAPA*. Campo Grande (MS), Dez, n.42, 2000. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html>. Arquivo capturado em 03 de fevereiro de 2006.

- GONZALES, J.C. *O controle do carrapato do boi*. 2ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995.
- GUY, B.; PASCAL, N.; FRANCON, A.; BONNIN, A.; GIMENEZ, S.; LAFAY-VIALON, E.; TRANNOY, E. & HAENSLER, J. Design, characterization and preclinical efficacy of a cationic lipid adjuvant for influenza split vaccine. *Vaccine*, 19: 1794–1805, 2001.
- HANNIER, S.; LIVERSIDGE, J.; STERNBERG, J.M. & BOWMAN, A.S. *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite Immunology*, 25: 27–37, 2003.
- HANNIER, S.; LIVERSIDGE, J.; STERNBERG, J.M. & BOWMAN, A.S. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. *Immunology*, 113: 401–408, 2004.
- HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W. & GEORGE, J. E. Characterization and molecular cloning of glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 737-743, 1999.
- HORN, F.; DOS SANTOS, P.C. & TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384: 68-73, 2000.
- HORN, S.C. & ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A Hora Veterinária*, 23: 12-32, 1985.
- HWANG, H. & CHUNG, H. Preparation of active recombinant cathepsin K expressed in bacteria as inclusion body. *Protein Expression and Purification*, 25: 541-546, 2002.

- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Pecuária Municipal*, Rio de Janeiro, v. 32, p.1-35, 2004. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.ibge.gov.br>. Arquivo capturado em 03 de fevereiro de 2006.
- JAWORSKI, D. C.; SIMMEN, F. A.; LAMOREAUX, W.; COONS, L. B.; MULLER, M. T. & NEEDHAM, G. R. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *Journal of Insect Physiology*, 41: 369-375, 1995.
- JOHNSTON, L.A.Y.; KEMP, D.H. & PEARSON, R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*, 16: 27-34, 1986.
- JONSSON, N.N.; MAYER, D.G. & GREEN, P.E. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology*, 88: 79-92, 2000.
- JOHNSON, D.R.; SALES, J. & MATTHEWS, J.B. Local cytokine responses in *Dictyocaulus viviparus* infection. *Veterinary Parasitology*, 128: 309–318, 2005.
- KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N. & OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 15-20, 1996.
- KASHINO, S.S.; RESENDE, J.; SACCO, A.M.S.; ROCHA, C.; PROENÇA, L.; CARVALHO, W.A.; FIRMINO, A.A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDES, M.; GERSHWIN, L.J. & DE MIRANDA SANTOS, I.K.F. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Experimental Parasitology*, 110: 12–21, 2005.
- KAWALEK, J.C.; REW, R.S. & HEAVNER, J. Glutathione S-transferase, a possible drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*: comparative

activity of a combendazole-resistant and a susceptible strain. *International Journal for Parasitology*, 14: 173–175, 1984.

KOCAN, K.M. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*, 57: 121-151, 1995.

KRIEG, A.M.; YI, A.K.; MATSON, S.; WALDSCHMIDT, T.J.; BISHOP, G.A.; TEASDALE, R.; KORETZKY, G.A. & KLINMAN, D.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374: 546–549, 1995.

LA VALLIE, E.R.; DIBLASIO, E.A.; KOVACIC, S.; GRANT, K.L.; SCHENDEL, P.F. & MCCOY, J.M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology*, 11: 187-193, 1993.

LACLETTE, J. P.; SHOEMAKER, C. B.; RICHTER, D.; ARCOS, L.; PANTE, N.; COHEN, C.; BING, D. & NICHOLSON-WELLER, A. Paramyosin inhibits complement C1. *The Journal of Immunology*, 148: 124-128, 1992.

LEAL, A.T.; POHL, P.C.; FERREIRA, C.A.; NASCIMENTO-SILVA, M.C.; SORGINE, M.H.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P.L.; FARIAS, S.E.; DA SILVA VAZ JR., I. & MASUDA, A. Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 45: 107-114, 2006.

LEE, A.J.; HUNTLEY, J.; VAN DEN BROEK, A.; COATES, D. & ISAAC, R.E. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*, 105: 49-63, 2002.

LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ JR., I.; SORGINE, M.H.F.; PAIVA-SILVA, G.O.; FARIA, F.S.; ZINGALI, R.; ROSA DE LIMA, M.; ABREU, L.; OLIVEIRA, E.F.; ALVES, E.W.; MASUDA, H.; GONZALES, J.C.; MASUDA, A. & OLIVEIRA, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 116: 525-532, 1998.

- LOGULLO, C.; MORAES, J.; DANSAPETRETSK, I.M.; DA SILVA VAZ, I.; MASUDA, A.; SORGINE, M.H.; BRAZ, G.R.; MASUDA, H. & OLIVEIRA, P.L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1805-11, 2002.
- MAROTO, M.; ARREDONDO, J. J.; SAN ROMAN, M.; MARCO, R. & CERVERA, M. Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 4375-4382, 1995.
- MARTINS, J.R. & FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *The Veterinary Record*, 149 (2): 64, 2001.
- MAYA-MONTEIRO, C.M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; LARA, F.A.; ALVES, E.W.; CAPURRO, M.L.; ZINGALI, R.; ALMEIDA, I.C. & OLIVEIRA, P.L. HeLp, a Heme Lipoprotein from the Hemolymph of the Cattle Tick, *Boophilus microplus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 36584–36589, 2000.
- MAYA-MONTEIRO, C.M.; ALVES, L.R.; PINHAL, N.; ABDALLA, D.S.P. & OLIVEIRA, P.L. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 81–87, 2004.
- McCOSKER, P. L. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M. & KREIR, J. P. (Eds.) *Babesiosis*. New York: Academic Press, 1981.
- MICHALAK, M.; MILNER, R. E.; BURNS, K. & OPAS, M. Calreticulin. *Biochemical Journal*, 285: 681-692, 1992.
- MDIC, Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio. *Exportações e Importações de Carne Bovina, jan. a dez. 2005*. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.abiec.com.br/estatisticas/50.pdf>. Arquivo capturado em 11 de março de 2006.
- MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; SAKO, Y.; OHASHI, K.; MUSOKE, A.; MOZARIA, S. & ONUMA, M. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine

against tick infestation in rabbits. *Infection and Immunity*, 67: 1652–1658, 1999.

NARI A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Veterinary Parasitology*, 57: 153-165, 1995.

NGUYEN, L. H. & BURGESS, R. R. Overproduction and Purification of sS, the *Escherichia coli* Stationary Phase Specific Sigma Transcription Factor. *Protein Expression and Purification*, 8: 17–22, 1996.

NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 18: 155-166, 1985.

NORTON, G.A.; SUTHERST, R.W. & MAYWALD, G.F. A framework for integrating control methods against the cattle tick, *Boophilus microplus*, in Australia. *Journal of Applied Ecology*, 20: 489-505, 1983.

NUTTALL, P.A. & LABUDA, M. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129: S177–S189, 2004.

O'NEILL, G.M.; DONOVAN, G.R. & BALDO, B.A. Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1219: 521-528, 1994.

OPDEBEECK, J.P. Vaccines against blood-sucking arthropods. *Veterinary Parasitology*, 54: 205-222, 1994.

PATARROYO, J.H.; PORTELA, R.W.; DE CASTRO, R.O.; PIMENTEL, J.C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; VARGAS, M.I.; PRATES, A.A. & MENDES, M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88: 163-72, 2002.

- PRUETT, J.H. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International Journal for Parasitology*, 29: 25-32, 1999.
- REED, S.G. & CAMPOS-NETO, A. Vaccines for parasitic and bacterial diseases. *Current Opinion in Immunology*, 15(4): 456-60, 2003.
- RENARD, G.; GARCIA, J.F.; CARDOSO, F.C.; RICHTER, M.F.; SAKANARI, J.A.; OZAKI, L.S.; TERMIGNONI, C. & MASUDA, A. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1017-26, 2000.
- RENARD, G.; LARA, F.A.; DE CARDOSO, F.C.; MIGUENS, F.C.; DANSA-PETRETSKI, M.; TERMIGNONI, C. & MASUDA, A. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Molecular Biology*, 11: 325-8, 2002.
- RIBEIRO, J.M.C. Role saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology*, 7: 15-20, 1989.
- RIDING, G.A.; JARMEY, J.; MAKENNA, R.V.; PEARSON, R.; COBON, G.S. & WILLADSEN, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *Journal of Immunology*, 153: 5158-5166, 1994.
- ROBERTS, J. A. & KERR, J. D. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. *Journal of Parasitology*, 62: 485-488, 1976.
- RODRIGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHET, M.; MONTESINOS, R.; CREMATA, J.; FÁLCON, V.; SÁNCHEZ, G.; BRINGAS, R.; CORDOVÉS, C.; VALDÉS, M.; LLEONART, R.; HERRERA, L. & DE LA FUENTE, J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of Biotechnology*, 33: 135-146, 1994.

- RODRIGUEZ, M.; PENICHER, M.L.; MOURIS, A.E.; LABARTA, V.; LORENZO LUACES, L.; RUBIERA, R.; CORDOVÉS, C.; SÁNCHEZ, P.A.; RAMOS, E.; SOTO, A.; CANALES, M.; PALENZUELA, D.; TRIGUERO, A.; LLEONART, R.; HERRERA, L. & DE LA FUENTE, J. Control of *Boophilus microplus* population in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology*, 57: 339-349, 1995.
- ROSA DE LIMA, M.F.; FERREIRA, C.A.S.; FREITAS, D.R.J.; VALENZUELA, J.G. & MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 747-754, 2002.
- SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A. & HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 95:53-62, 2001.
- SACHDEV, D. & CHIRGWIN, J.M. Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to Maltose-binding protein or Thioredoxin. *Protein Expression and Purification*, 12: 122-132, 1998.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAMISH, M. & GLAZER, I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*, 17: 368-371, 2001.
- SAMISH, M.; GINSBERG, H. & GLAZER, I. Biological control of ticks. *Parasitology*, 129: S389–S403, 2004.
- SANDERS, M.L.; JAWORSKI, D.C.; SANCHEZ, J.L.; DEFRAITES, R.F.; GLASS, G.E.; SCOTT, A.L.; RAHA, S.; RITCHIE, B.C.; NEEDHAM, G.R. & SCHWARTZ, B.S. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59: 279-285, 1998.

- SANDERS, M.L.; GLASS, G.E.; NADELMAN, R.B.; WORMSER, G.P.; SCOTT, A.L.; RAHA, S.; RITCHIE, B.C.; JAWORSKI, D.C. & SCHWARTZ, B.S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *American Journal of Epidemiology*, 149: 777-784, 1999.
- SARDANA, V.; XU, B.; ZUGAY-MURPHY, J.; CHEN, Z.; SARDANA, M.; DARKE, P.L.; MUNSHI, S. & KUO, L. A general procedure for the purification of human B-secretase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 34: 190-196, 2004.
- SCHEIN, C.H. & NOTEBORN, M.H.M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *European Journal of Biochemistry*, 229: 533–539, 1988.
- SEDDON, H.R. Arthropod Infestations, Ticks and Mites. In: ALBISTON, H.E. *Diseases of Domestic Animals in Australia*. Commonwealth of Australia, Dept. Health, Canberra, 1967.
- SEIFERT, G.W.; SPRINGELL, P.H. & TATCHELL R.J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, 58: 415-430, 1968.
- SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P.C.; VELLOSO, F.F.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A.; HORN, F. & TERMIGNONI, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126: 155-163, 2003.
- SINGH, M.; BRIONES, M.; OTT, G. & O'HAGAN, D. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(2): 811–816, 2000.
- SINGH, M. & O'HAGAN, DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International Journal for Parasitology*, 33: 469–478, 2003.

- SOLOMON, J.S.; NIXON, C.P.; MCGARVEY, S.T.; ACOSTA, L.P.; MANALO, D. & KURTIS, J.D. Expression, purification, and human antibody response to a 67 kDa vaccine candidate for shistosomiasis japonica. *Protein Expression and Purification*, 36: 226-231, 2004.
- SORGINE, M.H.; LOGULLO, C.; ZINGALI, R.B.; PAIVA-SILVA, G.O.; JULIANO, L. & OLIVEIRA, P.L. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 28659-28665, 2000.
- STUDIER, F.W. & MOFFAT, B.A. Use of bacteriophage-T7 RNA-polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189: 113-130, 1986.
- SUTHERST, R.W.; JONES, R.J. & SCHNITZERLING, H.J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*, 295: 320-321, 1982.
- SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G.F.; KERR, J.D. & SIEGEMAN, D.A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34: 317-327, 1983.
- TELLAM, R.L.; KEMP, D.; RIDING, G.; BRISCOE, S.; SMITH, D.; SHARP, P.; IRVING, D. & WILLADSEN, P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*, 103: 141-156, 2002.
- TRIMNELL, A.R.; HAILS, R.S. & NUTTALL, P.A. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine*, 20: 3560-3568, 2002.
- TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I. & ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28: 1-8, 2003.

- ULRICH, J.T. & MYERS, K.R. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant: past experiences and new directions. *Pharmaceutical Biotechnology*, 6: 495–524, 1995.
- URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M. & JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- VALENZUELA, J.G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology*, 129: S83–S94, 2004.
- WAGLAND, B.M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 401-409, 1978.
- WALDVOGEL, A.S.; HEDIGER-WEITHALER, B.M.; EICHER, R.; ZAKHER, A.; ZARLENGA, D.S.; GASBARRE, L.C. & HEUSSLER, V.T. Interferon-g and Interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77: 201-212, 2000.
- WANG, H. & NUTTALL, P.A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, 109: 525–530, 1994.
- WANG, H. & NUTTALL, P.A. Immunoglobulinbinding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56: 286–295, 1999.
- WHARTON, R.H. & NORRIS, K.R. Control of Parasitic Arthropods. *Veterinary Parasitology*, 6: 135-164, 1980.
- WIKEL, S.K. Tick Modulation of Host Cytokines. *Experimental Parasitology*, 84: 304-309, 1996.

- WIKEL, S.K. & ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. *Immunology*, 30: 311–316, 1976.
- WIKEL, S.K. & BERGMAN, D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, 13: 383-389, 1997.
- WILLADSEN, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, 101: 353–367, 2001.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, 129: S367–S387, 2004.
- WILLADSEN, P. & KEMP, D.H. Vaccination with ‘concealed’ antigens for tick control. *Parasitology Today*, 4: 196–198, 1988.
- WILLADSEN, P.; MCKENNA, R.V. & RIDING, G.A. Isolation from the cattle tick, *B. microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *International Journal for Parasitology*, 18: 183–189, 1988.
- WILLADSEN, P.; COBON, G. & MCKENNA, R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*, 18: 241-246, 1996.
- WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G.S. & HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 110: S43-S50, 1995.
- WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology*, feb 21, 2006.
- YANG, X.A.; DONG, X.Y.; LI, Y.; WANG, Y.D. & CHEN, W.F. Purification and refolding of a novel cancer/testis antigen BJ-HCC-2 expressed in the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 33: 332-338, 2004.

- YOUNG, A.S. & MORZARIA, S.P. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, 2: 211-219, 1986.
- YUAN, S.; DUAN, H.; LIU, C.; LIU, X.; LIU, T.; TAO, H. & ZHANG, Z. The role of thioredoxin and disulfide isomerase in the expression of the snake venom thrombin-like enzyme calobin in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Protein Expression and Purification*, 38: 51–60, 2004.
- ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P.W.; GINSBERG, H.S. & LEBRUN, R.A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal for Parasitology*, 83: 815-818, 1997.

6. ANEXOS

ANEXO 1

Resumo apresentado na IV Reunião Anual do PPGBCM - 2002

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO CARRAPATO BOOPHILUS

MICROPLUS PARA USO EM VACINAS

Leal, A T(1); Farias; S E(1,2); Da Silva Vaz Jr, I(1,3) Masuda, A(1,4)

UFRGS, 1- C. Biotecnologia 2- Depto Fisiologia 3- Fac. Veterinária 4- Depto Biol. Molecular e Biotecnologia. atleal@dna.cbiot.ufrgs.br

O carrapato *Boophilus microplus* é o mais importante ectoparasita dos rebanhos bovinos em áreas tropicais e subtropicais, causando grandes prejuízos econômicos à atividade pecuária. O controle imunológico é uma das formas alternativas de controle do parasita. Estudos com uma glicolipoproteína de 50 kDa, chamada de BYC (*Boophilus* *Yolk* *Catepsin*), demonstraram que essa proteína induz produção de anticorpos em bovinos imunizados e que esses anticorpos afetam o ciclo de desenvolvimento do *B. microplus*. O presente projeto visa a produção da BYC recombinante, para avaliar o potencial imunogênico da proteína recombinante, bem como a possibilidade de utilização de uma vacina de DNA. O gene da BYC foi clonado no vetor de expressão procariota pET-23d (NOVAGEN) e no vetor de expressão para células de mamíferos pcDNA3 (Invitrogen). Para obtenção das construções, esses vetores e o gene da BYC, amplificado por PCR, foram clivados com as enzimas BamHI e NcoI (pET) e BamHI e XhoI (pcDNA3). Após, os insertos e vetores foram ligados (T4 DNA ligase) e inseridos em bactérias *E. coli*. Os clones selecionados foram testados quanto ao tamanho dos fragmentos inseridos por enzimas de restrição e PCR. Para a expressão da BYC recombinante, as bactérias transformadas foram cultivadas e induzidas com IPTG. As células foram lisadas e o sobrenadante e o sedimento obtidos foram testados para presença de BYC através de imunoblot com um mAb anti-BYC (BrBm5). A BYC recombinante foi detectada apenas no sedimento. Para avaliação da capacidade de expressão em células de mamíferos, o vetor pcDNA3-BYC foi transfectado em células da linhagem COS-1 pelo método de transfecção com lipídios catiônicos. Após, as células foram cultivadas e a expressão verificada 48-72hs pós-transfecção, através das técnicas de imunoperoxidase e imunoblot, utilizando o mAb BrBm5. Até o momento não foi detectado BYC pelas técnicas mencionadas. Paralelamente, está sendo realizado um ensaio de imunização com DNA. Três camundongos BALB/C estão sendo imunizados com 10ug de pcDNA3-BYC. Após 3 doses, amostras de soro serão coletadas e testadas para detecção de anticorpos anti-BYC.

Financiamento: Pronex-CNPq, Fapergs

Bolsa: CNPq

ANEXO 2

Resumo apresentado na V Reunião Anual do PPGBCM - 2003

CLONAGEM, EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DE UMA ASPARTICO PROTEINASE RECOMBINANTE DE BOOPHILUS MICROPLUS

Leal, A T(1); Farias; S E(1,2); Da Silva Vaz Jr, I(1,3) Masuda, A(1,4)

UFRGS, 1- C. Biotecnologia 2- Depto Fisiologia 3- Fac. Veterinária 4- Depto Biol. Molecular e Biotecnologia. E-mail: atleal@cbiot.ufrgs.br

A glicolipoproteína BYC (Boophilus Yolk pro-Cathepsin) atua na embriogenese do *B. microplus*. Sua imunogenicidade associada ao seu potencial imunoprotetor habilita esse antígeno para uso no controle imunológico desse carrapato. Esse trabalho visou avaliar a capacidade imunogênica da BYC recombinante. O cDNA da BYC foi clonado no vetor pET-32b e expresso em *E. coli* AD494pLysS. A BYCr foi detectada apenas no sedimento do lisado da cultura, indicando sua expressão em corpúsculos de inclusão (CI). Os CIs foram parcialmente purificados com lavagens em tampão tris/1% de triton (BYCr-Trx-CI) e solubilizados pelo tratamento com 50mM de CAPS/Sarcosine (BYCr-Trx-CAPS). Essas duas preparações, bem como a BYC nativa (BYCn) e a TRX foram associadas ao adjuvante Montanide e inoculadas subcutâneamente em camundongos e bovinos. Quinze camundongos divididos em 5 grupos (3/grupo) receberam os seguintes tratamentos: G1- controle (Tris/ Montanide); G2- BYCr-Trx-CI; G3- BYCr-Trx-CAPS; G4- BYCn; G5- TRX. Cada animal recebeu 4 doses de 100ug de proteína em 100ul de Tris + 100ul de Montanide, com intervalos de 2 semanas. Um bovino foi imunizado com o mesmo protocolo utilizado no grupo 2. A presença de IgG específica em amostras de soro pós-vacinação foi verificada por imunoblot e ELISA frente a BYCr e BYCn. Os controles (G1 e G5) não apresentaram anticorpos. O imunoblot do grupo imunizado com BYCn revelou anticorpos que reconheceram tanto a BYCn como a BYCr-Trx, com título de 1.600 no ELISA com ambos antígenos. Porém, os grupos imunizados com a proteína recombinante (G2 e G3) reconheceram fracamente a BYCn. O título de anticorpos dos grupos 2 e 3 no ELISA foi igual ou maior que 1.600 frente a BYCr-Trx (parcialmente purificada) e, de 200 frente a BYCn. O bovino imunizado com BYCr-Trx-CI apresentou resultados semelhantes, com título alto frente a BYCr-Trx (3.200) e baixo (200) frente a BYCn. No imunoblot o soro bovino reconheceu fracamente a BYCn. Os resultados indicam que a proteína recombinante é imunogênica, entretanto a resposta originada por esse antígeno tem baixa reatividade com a BYCn. Uma possível causa dessa diferença de reatividade é a ausência da porção glicolipídica, sendo necessário mais estudos para comprovação dessa hipótese.

Financiamento: Pronex-CNPq, Fapergs

Bolsa: CNPq

ANEXO 3
Resumo apresentado na XXXIII Reunião Anual da SBBq
Caxambu, MG - 2004

Boophilus Yolk pro-Cathepsin cloning, expression and analysis of immunogenicity

Leal, A.T.¹; Pohl, P.C.¹; Logullo, C.⁴; Sorgine, M.⁵; Farias, S. E.¹; Vaz, I^{1,2}; Masuda, A.^{1,3}

¹Centro de Biotecnologia, ²Faculdade de Veterinária, ³Depto Biol. Mol. e Biotecnologia - UFRGS, Porto Alegre; ⁴Setor Bioq. de Insetos - UENF, Campos RJ; ⁵Depto Bioq. Médica - UFRJ.

The *Boophilus microplus* tick is the major bovine ectoparasite and causes important economical losses on cattle breeding. The immunologic control has been studied as alternative method for the tick control, actually based in acaricides. The *Boophilus Yolk pro-Cathepsin* (BYC) a glycoprotein that acts on tick embryogenesis is an immunogenic antigen. When inoculated on bovines, the BYC induced humoral response partially protective against *B. microplus*. The objective of this study was to produce the recombinant BYC (rBYC) and evaluate its immunogenic potential. The cDNA of BYC was amplified by PCR using specific primers and the amplicons ligated in pET-32b expression vector, with thioredoxin fusion protein (Trx) and histidine tag. The BYC-pET-32b vector was transformed in *E. coli* (AD494pLysS) for expression of the recombinant protein. Analysis of the expression was performed by SDS-PAGE and Western blot using a monoclonal anti-BYC and anti-histidine. The rBYC-Trx expressed in inclusion bodies was partially purified and used to immunize mouse and bovine. Five groups of mice were immunized with: 1-BYCr-Trx inclusion body (rBYC-IB); 2- rBYC-Trx-CAPS solubilized; 3- native BYC (nBYC); 4- Trx; 5- only adjuvant. Montanide was used as adjuvant in all groups. Three mice per group received four subcutaneous inoculations of 100ug of protein plus adjuvant. One bovine was immunized with rBYC-Trx-IB with similar protocol. The effects of the immunizations was evaluated by Western blot assay using rBYC-Trx and nBYC as antigen. Antisera from mice immunized with nBYC recognized nBYC as well as rBYC. However, mice immunized with rBYC-Trx-IB or rBYC-Trx-CAPS showed weak reactivity against nBYC in Western blot assay. The bovine serum reacted weakly against rBYC and nBYC and strongly with Trx in Western blot assay suggesting that the fusion protein caused the low immunogenicity of rBYC by antigenic competition. The production of recombinant BYC without fusion protein may improve the rBYC potential for the vaccine development.

Supported by: PRONEX; CNPq; FAPERGS

ANEXO 4
Resumo apresentado na XXXIV Reunião Anual da SBBq
Águas de Lindóia, SP - 2005

Influence of thioredoxin fusion protein in solubilization, refolding and antigenicity of an aspartic proteinase of *Boophilus microplus* expressed in inclusion bodies

Alexandre T. Leal¹; Paula C. Pohl¹; Carlos A.S. Ferreira⁵; Carlos Logullo⁶; Marcos Sorgine⁷;
Sandra E. Farias^{1,2}; Itabajara S. Vaz^{1,3}; Aoi Masuda^{1,4}

¹Centro de Biotecnologia, ²Depto de Fisiologia, ³Faculdade de Veterinária, ⁴Depto Biol. Mol. e Biotecnologia - UFRGS, Porto Alegre; ⁵PUC-RS, Porto Alegre-RS; ⁶Setor Bioq. de Insetos - UENF, Campos RJ; ⁷Depto Bioq. Médica -UFRJ.

The tick *Boophilus microplus* is a bovine ectoparasite, present in tropical and subtropical areas of the world. The tick control is based on the use of acaricides, which have high costs and induce resistance. The immunologic control has been studied as an alternative method for the tick control. BYC (*Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin) is an aspartic proteinase found in eggs and involved in embryogenesis of *B. microplus*, which has been proposed as an important antigen in vaccine development. The cDNA of BYC was amplified by PCR and it was cloned for expression in two forms, with thioredoxin fusion protein (Trx) and without Trx, coding the recombinant proteins named rBYC-Trx and rBYC, respectively. Expression, solubility and refolding yield of the two forms were analyzed. The recombinant proteins were expressed in inclusion bodies (IBs) and three denaturant agents (N-lauroyl sarcosine, guanidine hydrochloride and urea) were tested for IBs solubilization. The N-lauroyl sarcosine solubilized 90.4 % and 92.4 % of rBYC-Trx and rBYC IBs, respectively and was the most efficient denaturant. Two recombinant forms were purified with Ni²⁺ sepharose resin under denaturing conditions. After refolding, the yield of soluble protein was of 84.1 % for r-BYC-Trx and 5.9 % for rBYC. These proteins were immuno-reactive with sera of rabbit, mouse and bovine previously immunized with native BYC, which confirm the antigenicity of the recombinant BYCs expressed in the *E. coli* system.

Supported by: PRONEX; CNPq; FAPERGS.